

**Differenzielle Einzelzell-Transkriptomanalyse zur  
Identifizierung geruchsrezeptorassoziierter  
Differenzierungsmoleküle während der Entwicklung  
des olfaktorischen Systems der Maus**



---

seit 1558

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium**  
**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Natja Haag  
geboren am 18.06.1977 in Zeulenroda

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Bolz  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstraße 1  
07743 Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Siegrid Löwel  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstraße 1  
07743 Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Sigrun Korsching  
Universität zu Köln  
Institut für Genetik  
Zülpicher Str. 47  
50674 Köln

Tag der Disputation: 14.12.2009

*"The pure and simple truth is rarely pure and never simple."*

— Oscar Wilde, *The Importance of Being Earnest*, 1895,  
Act I, Irish dramatist, novelist, & poet (1854 - 1900)

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Geruchssystem der Säuger.....	1
1.1.1 Funktionelle Anatomie der olfaktorischen Projektion .....	3
1.1.2 Geruchsrezeptoren: Genomische Organisation und Genregulation .....	6
1.1.3 Transduktion olfaktorischer Signale .....	7
1.2 Das olfaktorische System als Modell neuroentwicklungsbiologischer Elementarprozesse.....	9
1.2.1 Neurogenese und Zelldifferenzierung .....	9
1.2.2 Ausbildung der olfaktorischen Projektion: Mechanismen der Axonlenkung.....	11
1.2.3 Aktivitätsabhängige Prozesse zur Feinjustierung synaptischer Verschaltungen .....	13
1.3 Bedeutung nicht-kodierender RNAs bei der Steuerung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen .....	14
1.4 Zielstellung und experimentelle Strategie.....	16
2. Material & Methoden .....	18
2.1 Organismen.....	18
2.1.1 Versuchstiere.....	18
2.1.2 Bakterien.....	18
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden.....	18
2.2.1 Kultivierung transformierter E.coli-Bakterien .....	19
2.2.2 Präparation und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	19
2.2.3 Synthese von Nukleinsäuren.....	21
2.2.4 Qualitative und quantitative Analyse von Nukleinsäuren .....	22
2.2.5 Enzymatische Manipulation von DNA .....	25
2.2.6 Transformation durch Elektroporation .....	26
2.3 Herstellung und Screening von 3'-cDNA-Tag-Bibliotheken aus Einzelzellen.....	27
2.3.1 Gewinnung einzelner Riechsinneszellen.....	27
2.3.2 Herstellung von Einzelzell-cDNA-Tags.....	28
2.3.3 Klonierung der cDNA-Bibliothek .....	30
2.3.4 Herstellung und Screening der Kolonie-Filter.....	36
2.4 Histologische Methoden.....	40
2.4.1 OMP-Immunfärbung .....	40
2.4.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	41
2.4.3 <i>In-situ</i> -Hybridisierung mit kombinierter GFP-Immunfluoreszenz.....	43
2.4.4 Nissl-Färbung .....	44
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Methodische Resultate.....	46
3.1.1 Etablierung eines Verfahrens zur effizienten und schonenden Dissoziation von Riechepithel zur Gewinnung von Einzelzellen .....	46
3.1.2 Entwicklung eines Protokolls für Synthese und Amplifikation einer transkriptom-treuen Bibliothek von 3'-cDNA-Tags aus einzelnen olfaktorischen Neuronen.....	50
3.1.3 Nachweis der transkriptom-treuen Amplifizierung der Einzelzell-cDNA-Tags .....	55



3.1.4 3R-Ligation: Kontrollierte Klonierung komplexer 3'-cDNA-Tags .....	57
3.1.5 Effiziente Markierung hoch komplexer Sondenpopulationen und Etablierung von nahezu hintergrundfreier Kolonie-Filterhybridisierung .....	62
3.2 Biologische Ergebnisse.....	67
3.2.1 3'-cDNA-Tags individueller olfaktorischer Neuronen als Ausgangs-material für das Screening einer mOR37B <sub>unreif</sub> -spezifischen-Bibliothek .....	67
3.2.2 Die 3'-cDNA-Tag-Bibliothek.....	70
3.2.3 Sequenzen und Repräsentation mOR37B <sub>unreif</sub> -spezifisch exprimierter Gene .....	74
3.2.4 <i>In-situ</i> -Verifizierung ausgewählter mOR37B <sub>unreif</sub> -spezifischer Transkripte im olfaktorischen System mOR37B-EGFP-transgener Mäuse .....	76
4. Diskussion .....	83
4.1 Methodische Herausforderung Einzelzell-Transkriptom-Analyse .....	83
4.1.1 Eine globale Amplifikationsstrategie zur Generierung von 3'-cDNA-Tags aus Einzelzellen als Basis für differenzielle Transkriptom-Analysen .....	84
4.1.2 Die Isolierung von individuellen OSNs war kontaminationsfrei möglich und hatte keinen Einfluss auf die Transkriptrepräsentation.....	86
4.1.3 Die extreme Amplifikation von 3'-cDNA-Tags durch PCR führt nicht zu Verschiebungen in ihrer Repräsentation.....	87
4.1.4 Eine neue Ligationstechnik ermöglicht die hocheffiziente und repräsentationstreue Klonierung von 3'-cDNA-Tag-Bibliotheken .....	88
4.2 Beurteilung der mOR37B <sub>unreif</sub> -assoziierten Transkripte hinsichtlich ihrer Repräsentation und ihrer Expression im olfaktorischen System.....	90
4.2.1 Allgemeine Anmerkungen zu den Einflussfaktoren der Transkriptrepräsentation .....	90
4.2.2 Nach seinem Expressionsmuster ist <i>Tmsb10</i> nicht spezifisch für mOR37B <sub>unreif</sub> aber für unreife OSNs.....	91
4.2.3 Das in späten unreifen OSNs transkribierte <i>Gng8</i> wird zwar differenziell aber nicht mOR37B-spezifisch exprimiert.....	92
4.3 Das <i>ncRNA</i> -Transkript zeigt eine hoch selektive und vom Differenzierungsgrad abhängige Expression in mOR37B-Neuronen .....	94
4.3.1 Mögliche Funktionen der mOR37-assoziierten <i>ncRNA</i> auf der Basis erster bioinformatischer Daten .....	94
4.3.2 Selektive Expression der mOR37B <sub>unreif</sub> -assoziierten ncRNA in mOR37B-exprimierenden Neuronen.....	96
4.3.3 Mögliche Bedeutung von nicht-kodierenden RNAs bei der Regulation neuroentwicklungsbiologischer Prozesse im olfaktorischen System.....	97
4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick .....	100
5. Zusammenfassung.....	102
6. Summary .....	104
7. Literaturverzeichnis .....	106
Anhang I: Abkürzungen.....	I
Anhang II: Materialien.....	III
Anhang III: Tabellen .....	XI
Anhang IV: Zusätzliche Daten.....	XIV

## 1. EINLEITUNG

Sinnessysteme sind verantwortlich für die Generierung einer internen Repräsentation der äußeren Umwelt mit ihren chemischen (Schmecken, Riechen etc.) und physikalischen (Tasten, Hören, Sehen, Temperaturwahrnehmung etc.) Eigenschaften. Sie sind Grundlage für das Leben in und die Kommunikation mit einer vielfältigen Umwelt. In Abhängigkeit vom Lebensraum haben die einzelnen Sinnesmodalitäten dabei eine unterschiedliche Wertigkeit für die jeweilige Tierart. Betrachtet man die Klasse der Säugetiere, so ist der phylogenetisch ursprünglichste aller Sinne, der Geruchssinn, nicht für alle Vertreter dieser Gruppe gleichsam von Bedeutung, wie der Vergleich von Mensch und Hund verdeutlicht. Mit dem Übergang vom Wasser- zum Landleben stieg die Bedeutung von Duftstoffen bei der Vermittlung von Umweltinformationen wie der Lokalisation von Nahrungsquellen, der Orientierung im Gelände sowie als wichtiges inner- und zwischenartliches Kommunikationsmittel beispielsweise für das Sexualverhalten. Im Vergleich zum visuellen System, dessen strukturelle und funktionelle Komponenten bereits seit dem frühen 20. Jahrhundert zur Zeit Ramon y Cajals bekannt sind, gelangen Fortschritte bei der Aufklärung von Organisation und Entwicklung des Geruchssystems erst mit Klonierung der Geruchsrezeptoren der Ratte vor nunmehr fast zwanzig Jahren (Buck und Axel, 1991)<sup>1</sup>. Zusätzlich gestützt durch die Verfügbarkeit des vollständig sequenzierten Genoms von Mensch (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) und Maus (Waterston et al., 2002) sowie neuer molekularbiologischer Methoden führte dies in den vergangenen Jahren zu einem rasanten Erkenntniszuwachs im Verständnis zugrunde liegender Mechanismen. Unterdessen ist bekannt, dass etwa ein bis drei Prozent des zirka 30.000 proteinkodierende Gene umfassenden Säugergenoms allein für Geruchsrezeptoren kodiert, was eine enorme Bedeutung des Geruchssinnes für Säuger impliziert. Warum jedoch so viel genetische „Hardware“ bei der Vielzahl biologischer Prozesse in einem Organismus exklusiv für das Riechen reserviert ist und wie dieses komplexe Sinnessystem während der Embryonalentwicklung entsteht, ist in großen Teilen noch ungeklärt.

### 1.1 Das Geruchssystem der Säuger

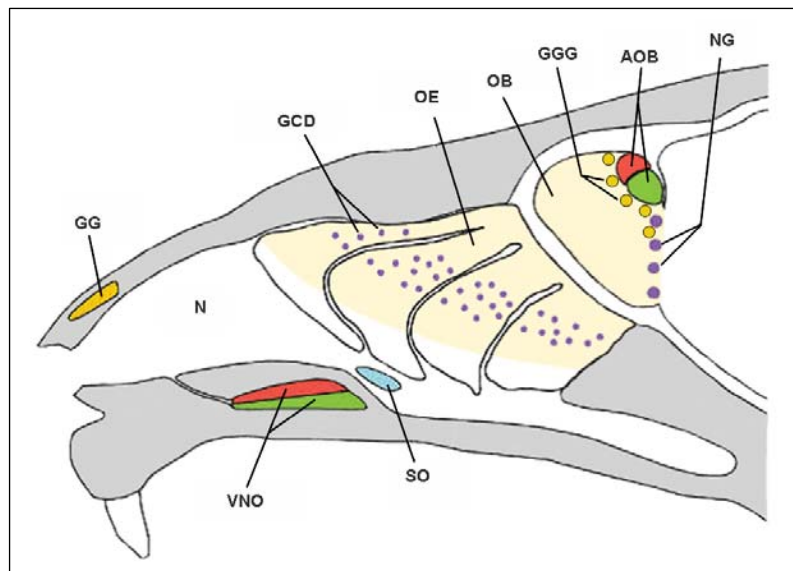
Säugetiere nutzen verschiedene chemosensorische Systeme zur Wahrnehmung von Duftstoffen, die über hochspezialisierte Detektoren, die chemosensorischen Neuronen, erfolgt. Generell werden zwei Hauptkomponenten, die strukturell wie funktionell verschieden sind, unterschieden: das allgemeine Geruchssystem mit dem Riechepithel,

---

<sup>1</sup> Für ihre Arbeiten zur Identifizierung der Geruchsrezeptoren und zur funktionellen Organisation des Geruchssystems erhielten Linda B. Buck und Richard Axel im Jahr 2004 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

welches primär für die Wahrnehmung und Unterscheidung der Vielzahl an flüchtigen Duftstoffen verantwortlich ist, und das Vomeronasalorgan, welches die Wahrnehmung von Pheromonen vermittelt, die spezifische Informationen über Art, Geschlecht und Identität eines Tieres tragen. Bisher hat man vier verschiedene Geruchsrezeptorfamilien bei Säugern identifiziert (Mombaerts, 1999; Dulac und Torello, 2003; Zufall und Leinders-Zufall, 2007), wobei die olfaktorischen Rezeptoren (ORs) sowie die „*trace amine*“-assoziierten Rezeptoren (TAARs) -jeweils exklusiv- von sensorischen Neuronen des Riechepithels exprimiert werden, die beiden anderen Rezeptorfamilien V1R sowie V2R von sensorischen Neuronen des vomeronasalen Epithels. Bemerkenswert dabei ist, dass einige der in Mäusen identifizierten TAARs flüchtige Amine aus Maus-Urin detektieren und damit wahrscheinlich an der Erkennung sozialer, wie z.B. stress- und geschlecht-assoziiierter Duftkomponenten beteiligt sind (Liberles und Buck, 2006). Damit negieren diese neueren Untersuchungen die bis dahin eher strikte funktionelle Einteilung von allgemeinem und akzessorischem Geruchssystem. Viele Arbeiten belegen zudem die Existenz weiterer olfaktorischer

Subsysteme wie dem Guanylatcyclase-D-System (Juilfs et al., 1997), dem Septalorgan (Broman, 1921; Rodolfo-Masera, 1943; Kaluza et al., 2004)



**Abb.1.1: Chemosensorische Komponenten des Geruchssystems der Maus.** Schematische Darstellung (sagittale Aufsicht auf eine Nasenhälfte) zur Verdeutlichung der Heterogenität der einzelnen olfaktorischen Subsysteme mit ihren korrespondierenden Zielgebieten im *Bulbus olfactorius* (OB). AOB, akzessorischer Bulbus; GCD, Guanylatcyclase-D-Neuronen; GGG, Glomeruli des Grüneberg-Ganglions (GG); NG, „necklace“ („Halsketten“)-Glomeruli; OE, olfaktorisches Epithel/Riechepithel; SO, Septalorgan; VNO, Vomeronasalorgan. Modifiziert nach Zufall et al. (2006).

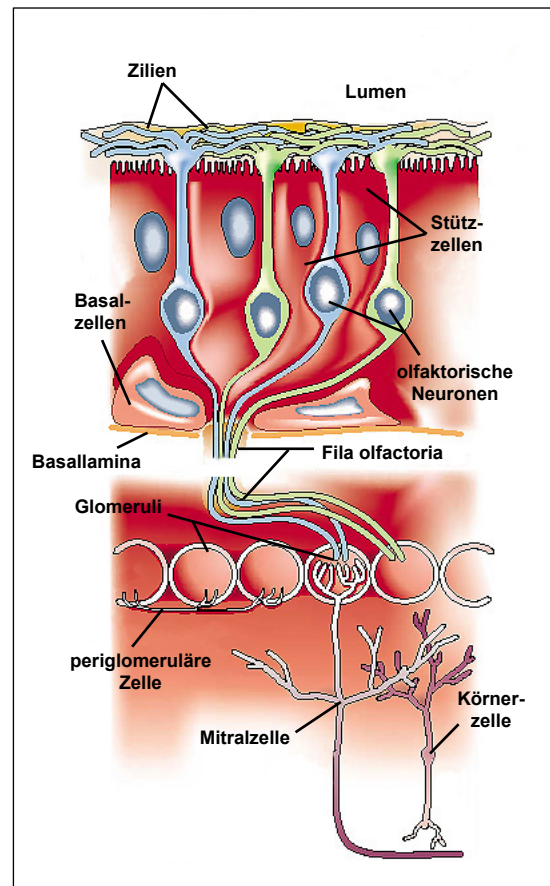
und dem Grüneberg-Ganglion (Grüneberg, 1973) (Abb.1.1). Die funktionelle Relevanz dieser olfaktorischen Subsysteme ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. So wird beispielsweise das GC-D-System mit so verschiedenen Funktionen wie der Detektion von Pheromonen (Juilfs et al., 1997), der Wahrnehmung von CO<sub>2</sub> (Hu et al., 2007) oder der Detektion natriuretischer Peptide (Leinders-Zufall et al., 2007) in Verbindung gebracht. Dem Septalorgan hingegen wird eine duale olfaktorische Funktion zugeschrieben, die wegen seiner unmittelbaren Lage an der Öffnung des *Ductus nasopalatinus*<sup>2</sup> der Detektion

<sup>2</sup> *Ductus nasopalatinus*: Verbindungsgang zwischen Mund- und Nasenhöhle.

nahrungsrelevanter Geruchsstoffe sowie der Wahrnehmung von Signalmolekülen, die Sozial- und Sexualverhalten steuern, dienen könnte (Breer et al., 2006). Für das Grüneberg-Ganglion vermutet man aufgrund seiner Position direkt am Eingang der Nasenhöhle eine „awareness“-Funktion, die eine frühzeitige Erkennung schlecht-flüchtiger oder toxischer Substanzen ermöglicht (Fuss et al., 2005). Im Folgenden wird ein Überblick zur funktionellen Architektur der einzelnen Komponenten des allgemeinen Geruchssystems sowie zu Mechanismen der embryonalen Entwicklung des Geruchssystems der Maus gegeben.

### 1.1.1 Funktionelle Anatomie der olfaktorischen Projektion

Die größte chemosensorische Sinnesoberfläche in der Nase bildet das Riechepithel (olfaktorisches Epithel), welches im postero-dorsalen Teil der Nasenhöhle auf knöchernen Ausstülpungen der Nasenhöhlenwand, den Turbinalien, aufliegt. Das Riechepithel ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Sinnesepithel und besteht im Wesentlichen aus drei verschiedenen Zelltypen: den Stützzellen, den Riechsinneszellen sowie den Basalzellen (Abb.1.2). Einige Autoren beschreiben mit den mikrovillären Zellen einen vierten Zelltyp, über dessen Funktion bis dato noch wenig bekannt ist (Elsaesser et al., 2005). Neben seiner sensorischen Funktion besitzt das Riechepithel zudem eine ausgeprägte, durch Zell-Zellkontakte wie *tight junctions* vermittelte Barrierefunktion. Diese Abgrenzung zur äußeren Umwelt wird auf der apikalen Epithelseite durch die Stützzellen realisiert (Hempstead und Morgan, 1983), die analog zur Neuroglia sowohl für die Gewebestatik als auch den Metabolismus des Riechepithels verantwortlich sind (Gu et al., 1998; Weiler und Farbman, 1998; Whitby-Logan et al., 2004). Stützzellen weisen apikal einen dichten Bürstensaum aus Mikrovilli auf und



**Abb. 1.2:** Schematische Querschnittsdarstellung zum zellulären Aufbau des Riechepithels sowie der glomerulären Projektion olfaktorischer Neurone zum *Bulbus olfactorius*. Verändert nach Firestein (2001).

produzieren zusammen mit den subepithelial gelegenen Bowman'schen Drüsen ein muköses Sekret, welches die Epitheloberfläche überzieht und geruchsstoff-bindende Proteine enthält (Pelosi, 2001). Die chemosensorischen „Detektoren“ des Riechepithels,

die Riechsinneszellen, sind primäre, bipolare Neuronen, deren Zellkörper in den mittleren Epithelschichten zwischen den Stützzellen liegen. Ihre Apikaldendriten enden in einer kolbenförmigen und 10-20 Zilien tragenden Auftreibung (*olfactory knob*) an der Epitheloberfläche. Auf den von Mukus umgebenen, unbeweglichen Zilien befinden sich die eigentlichen Sensoren der Geruchswahrnehmung, die Geruchsrezeptoren. Am basalen Pol der olfaktorischen sensorischen Neuronen treten unmyelinisierte Axone aus, die in der Submukosa faszikulieren und dort als *Fila olfactoria* durch die Siebbeinplatte zum Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) ziehen. Unterhalb von Stütz- und Riechsinneszellen nahe der Basallamina findet man das Stammzellreservoir des Riechepithels, die Basalzellen (Graziadei und Graziadei, 1979). Die regenerative Kapazität des Riechepithels ist enorm. Zeitlebens können alle im olfaktorischen Epithel vorkommenden Zelltypen regeneriert werden, allen voran die olfaktorischen Neuronen, die nur eine durchschnittliche Lebensdauer von ca. 2-3 Monaten haben. Morphologisch und anhand spezifischer Oberflächenmarker werden horizontale (*horizontal basal cells*, HBCs) und kugelige (*globose basal cells*, GBCs) Basalzellen unterschieden, wobei die GBCs als bipotente Vorläuferzellen gelten, die olfaktorische Neuronen und Stützzellen generieren können (Carter et al., 2004; Murdoch und Roskams, 2007). HBCs hingegen scheinen die eigentlichen, ruhenden, multipotenten Stammzellen zu sein, die bei starken Läsionen mit Verlust der GBC-Vorläuferzellen beginnen zu proliferieren (Leung et al., 2007). Obwohl adulte Neurogenese auch in anderen Regionen des Nervensystems beobachtet wird (Subventrikularzone (SVZ), Rostraler Migrationsstrom (RMS), Gyrus dentatus (GD)), ist die regenerative Aktivität des olfaktorischen Epithels wohl unerreicht.

Das olfaktorische System repräsentiert in paradigmatischer Weise ein fundamentales Verschaltungsmuster des Gehirns, die nicht-topographische Projektion. Im Gegensatz zu topographischen, nachbarschaftstreuen Projektionen wie beispielsweise im visuellen System, ist für das axonale Projektionsziel im primären olfaktorischen System die Spezifität des jeweiligen Neurons relevant, obwohl auch seine räumliche Position im OE eine gewisse Rolle spielt. Die Spezifität ist dadurch definiert, dass in jedem sensorischen Neuron nur eines der beiden Allele *eines* bestimmten Geruchsrezeptorgens aus einem Repertoire von ~1200 Genen exprimiert wird (Chess et al., 1994; Ishii et al., 2001). Zusätzlich zu seiner monoallelischen Auswahl inhibiert der exprimierte funktionelle Geruchsrezeptor die Expression eines weiteren Rezeptors über einen negativen Feedback-Mechanismus, sodass die Exklusivität eines Geruchsrezeptortyps pro Neuron und damit dessen Spezifität gewährleistet ist (Serizawa et al., 2003; Lomvardas et al., 2006). Sinneszellen einer Rezeptorspezifität sind dabei auf eine von vielen, überlappenden, in der Regel streifenförmigen Expressionsdomänen im olfaktorischen

Epithel beschränkt (Iwema et al., 2004; Miyamichi et al., 2005), innerhalb derer sie jedoch zusammen mit Neuronen hunderter anderer Rezeptorspezifitäten zufällig verteilt angeordnet sind. Eine Ausnahme dazu bilden die Rezeptoren der mOR37-Subfamilie, die in einem eng definierten zentralen Bereich, der die Endoturbinalien II' und III sowie Ektoturbinalie 3 umfasst, exprimiert sind (Strotmann et al., 1994). Markantes Merkmal der Projektion ist nun, dass alle Axone einer Spezifität auf ein bis zwei interindividuell stereotype Zielgebiete des *Bulbus olfactorius*, die Glomeruli, konvergieren, welche die erste Verschaltungsebene der Geruchsverarbeitung im Gehirn darstellen (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1996). Durch Induktion früher, aus der olfaktorischen Plakode einwachsender Axone entwickelt sich der mehrschichtige *Bulbus olfactorius* aus der Anlage des Telencephalons (Shepherd, 1972). Die äußerste Schicht (externe Faserschicht) wird von den Axonen der primären Riechsinneszellen gebildet, die den Bulbus als dichtes Fasergeflecht überziehen und in der darunter liegenden, glomerulären Schicht synaptische Kontakte mit den nachgeschalteten Projektionsneuronen, den Mitral- und Büschelzellen (M/T-Zellen) knüpfen. Zusammen mit den Primärdendritenbäumen der M/T-Zellen formen die Axonterminalen der olfaktorischen Neuronen hier kugelförmige Neuropil-Knäuel von 50-100 µm Durchmesser, die Glomeruli. Pro Glomerulus konvergieren einige 1000 Axone von olfaktorischen Neuronen *gleicher* Rezeptorspezifität, deren Information von mehreren monoglomerulären M/T-Zellen abgegriffen wird. Diese glomerulären Module repräsentieren somit einen einzigen Rezeptortyp und sind folglich „getuned“ auf spezifische molekulare Eigenschaften von Geruchsstoffen (Mori et al., 1999). Diverse, meist inhibitorische (GABAerg) Interneuronen modulieren diesen sensorischen Input auf verschiedenen Ebenen im Bulbus. In der äußeren plexiformen Schicht bilden periglomeruläre Zellen, die zu einer heterogenen Population juxtaglomerulärer Interneuronen gehören, mit transversalen Ausläufern dendro-dendritische Synapsen mit den Primärdendriten der Projektionsneuronen sowie anderen periglomerulären Zellen aus. Unterhalb der sich anschließenden Mitralzellschicht, in der die Somata der glutamatergen M/T-Zellen lokalisiert sind, befinden sich die Körnerzellen in der nach ihnen benannten, innersten Zellschicht des Bulbus. Sie bilden dendro-dendritische Synapsen mit den Sekundärdendriten von M/T-Zellen aus. Periglomeruläre Zellen und Körnerzellen modulieren über verschiedene Inhibitionsmechanismen (rekurrente und laterale Inhibition) die olfaktorischen Eingangssignale der Mitralzellen (Arevian et al., 2008; Pirez und Wachowiak, 2008) und generieren auch oszillatorische Aktivität im Bulbus (Kay et al., 2009). Über die Körnerzellen erhalten die Mitralzellen zudem inhibitorische und exzitatorische Rückprojektionen von zentrifugalen Fasern und dem anterioren olfaktorischen Nukleus.

Die im Riechkolben prozessierte Geruchsinformation wird anschließend über die Axone der Projektionsneuronen zu höheren Verarbeitungszentren im Gehirn (anterioren olfaktorischen Nukleus (AON), olfaktorischer Tuberkel (OT), piriformer Kortex (PK), entorhinaler Kortex (EK)), die als olfaktorischer Kortex zusammengefasst werden, weitergeleitet. Zum einen projizieren Fasern durch den anterioren olfaktorischen Nukleus über die anteriore Kommissur zum jeweils kontralateralen Bulbus. Die Hauptprojektion führt als direkte, extrathalamische Verbindung vom piriformen Kortex zum Orbitofrontalkortex - eine Besonderheit der olfaktorischen Projektion. Der für andere Sinnesmodalitäten charakteristische Projektionsverlauf *Sinnesorgan - Thalamus - Kortex* scheint im Geruchssystem nur von sehr untergeordneter Bedeutung zu sein. Vom Riechepithel über den *Bulbus olfactorius* projizieren die Fasern im lateralen olfaktorischen Trakt (LOT) zu Arealen des piriformen Kortex und von dort erst in den Mediodorsalkern des Thalamus, von wo aus die Information zum olfaktorischen Kortex im ventralen Frontallappen (Orbitofrontalkortex) weitergeleitet wird. Diese Umgehung des Thalamus in der Riechbahn ist vermutlich einzigartig unter den zentralen Sinnesbahnen. Neben diesem Weg der bewussten Geruchswahrnehmung innervieren auch einige Geruchsbahnen das limbische System. Dabei sorgen Verschaltungen mit Amygdala und entorhinalem Kortex für die Verknüpfung von Riechinformation mit emotionalen Inhalten, Erinnerungen, Assoziationen und Motivation. Über den Hypothalamus, der die Hypophyse und damit die Produktion vieler Hormone kontrolliert, wirken Geruchssignale zudem direkt auf das endokrine System. Hieraus wird deutlich, dass das Geruchssystem nicht in erster Linie zur bewussten Analyse der Atemluft dient, sondern aufgrund der vielfältigen Verbindungen mit dem limbischen System einen direkten, bewusstseinsunabhängigen Einfluss auf das Verhalten ausübt.

### 1.1.2 Geruchsrezeptoren: Genomische Organisation und Genregulation

Das Geruchssystem löst die anspruchsvolle Aufgabe der chemosensorischen Erkennung von Signalmolekülen in verschiedenen Spezies auf sehr unterschiedliche Weise. Trotz dieser Variabilität gehören alle bisher bekannten Geruchsrezeptoren ausnahmslos zur Familie G-Protein gekoppelter, heptahelikaler Rezeptoren (GPCRs). Die für die Geruchsrezeptoren kodierenden Gene sind Intron-frei und bilden die größten bisher bekannten Gen-Superfamilien bei Vertebraten und Invertebraten (z.B. *Caenorhabditis elegans* (Bargmann, 1998), *Drosophila melanogaster* (Benton, 2006)). Bei der Maus umfasst das Geruchsrezeptor-Repertoire insgesamt ca. 1200 Gene, von denen 900-1000 intakte Gene sind, die funktionelle Rezeptoren kodieren, und die verbleibenden 20 % als

Pseudogene<sup>3</sup> vorliegen. Die Zahl der Geruchsrezeptorgene entspricht etwa 3 % des Maus-Genoms und übertrifft damit sogar das Gen-Repertoire von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptoren zusammen (Zhang und Firestein, 2002; Godfrey et al., 2004). Im Vergleich dazu findet man beim Menschen nur ca. 650-900 Geruchsrezeptorgene mit ~350 funktionellen Genen und einem viel höheren Pseudogen-Anteil von 40-60 % (Glusman et al., 2001; Zozulya et al., 2001; Malnic et al., 2004). Geruchsrezeptoren werden aufgrund von Sequenzhomologien in zwei Klassen und innerhalb derer in insgesamt 241 Gen-Subfamilien unterteilt. Man findet sie gruppiert in Gen-Clustern auf fast allen Chromosomen außer 5, 12, 18 und Y mit intergenischen Abständen von bis zu 50 kb (Zhang und Firestein, 2002; Godfrey et al., 2004). Das große Repertoire an Rezeptorgenen und ihre einzigartige genomische Organisation stellen dabei ungeahnte Anforderungen an die Mechanismen der Genregulation, die die Expression eines einzelnen funktionellen Rezeptors pro Neuron gewährleisten müssen. Gegenwärtig geht man von einem stochastischen Modell der Geruchsrezeptorauswahl aus. Regulatorische DNA-Elemente wie die hochgradig konservierte, homologe H-Region auf Chromosom 14 (Serizawa et al., 2003; Lomvardas et al., 2006) oder das P-Element auf Chromosom 7 (Bozza et al., 2009) können mit mehreren Promotoren von Geruchsrezeptorgenen in *cis* und in *trans* im Sinne eines *Enhancers* interagieren, woraufhin eines der beiden vorhandenen Allele zufällig aktiviert und dessen Transkription eingeleitet wird. Kodiert der aktivierte GenLocus einen funktionellen Rezeptor, unterbindet das Rezeptorprotein über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Expression weiterer OR-Genloci. Folgt der Promotor-Aktivierung jedoch die Expression eines nicht-funktionellen Pseudogens, werden zusätzliche Promotorregionen für die Expression ausgewählt, um eine selektive und exklusive Expression *eines* Rezeptortyps in olfaktorischen sensorischen Neuronen sicher zu stellen (Serizawa et al., 2003; Lomvardas et al., 2006). Insgesamt betrachtet, sind die Geruchsrezeptorproteine maßgeblich an drei unterschiedlichen, fundamentalen Aspekten olfaktorischer Funktion beteiligt: der Duftstoff-Erkennung, der Axonlenkung- bzw. -wegfindung (s.u.) sowie der Regulation der Rezeptorexpression.

### 1.1.3 Transduktion olfaktorischer Signale

Um Informationen über Art und Konzentration verschiedener, aus der Umwelt aufgenommener Duftstoffe verarbeiten zu können, muss die chemische Information zunächst in elektrische Signale umgewandelt werden. Primäres Ereignis in der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade ist die spezifische Bindung von Duftstoff-Molekülen an die in der Zilienmembran olfaktorischer Neuronen lokalisierten

---

<sup>3</sup> Als Pseudogene bezeichnet man funktionslose, inaktive Gene, die durch fehlerhafte Genduplikation oder Akkumulation von Mutationen entstanden sind. Sie sind gekennzeichnet durch Insertionen, Deletionen, Stop-Kodons oder Verschiebungen im Leseraster in der ursprünglich protein-kodierenden Sequenz.



Geruchsrezeptoren. Durch Aktivierung des G-Proteins  $G_{olf}$  kommt es zu einer erhöhten Adenylatzyklase-III-Aktivität, die wiederum einen Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Folge hat und die Öffnung zyklisch-nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle (CNG-Kanäle) bewirkt. Durch diese strömen  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle. Die  $Ca^{2+}$ -Ionen öffnen daraufhin  $Ca^{2+}$ -gesteuerte  $Cl^-$ -Kanäle, durch die  $Cl^-$ -Ionen aus der Zelle fließen — ein sehr ungewöhnlicher Ionenfluss, durch den die Aktivierung von Riechsinneszellen unabhängig von Fluktuationen des extrazellulären Milieus ermöglicht wird (Lowe und Gold, 1993). Normalerweise ist die intrazelluläre Konzentration an  $Cl^-$ -Ionen 30 Mal geringer als außerhalb ( $[Cl^-]_{innen} = 4 \text{ mM}$ ,  $[Cl^-]_{außen} = 120 \text{ mM}$ ). Die ungewöhnlich hohe  $Cl^-$ -Konzentration in den olfaktorischen Neuronen wird durch aktive Aufnahme von  $Cl^-$ -Ionen durch den  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter *NKCC1* erreicht. Zudem fehlt den Riechsinneszellen der  $Cl^-$ -Transporter *KCC2*, der in Nervenzellen  $Cl^-$ -Ionen aus der Zelle entfernt. Da  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen durch die CNG-Kanäle einströmen und  $Cl^-$ -Ionen durch die  $Cl^-$ -Kanäle ausströmen, depolarisiert die Zelle, was schließlich die Generierung von Aktionspotenzialen auslöst. Die Bindung von Duftstoff an den Rezeptor ist nur von sehr kurzer Dauer, da die Affinität des Rezeptors für den Duftstoff relativ gering ist und damit auch die Wahrscheinlichkeit der  $G_{olf}$ -Aktivierung. Ein von einem Duftstoffmolekül besetzter Rezeptor aktiviert durchschnittlich weniger als ein  $G_{olf}$  (Bhandawat et al., 2005). Zudem besitzt die Adenylatzyklase nur eine niedrige Aktivität, d.h. sie synthetisiert cAMP nur langsam (Takeuchi und Kurahashi, 2005). In diesem ersten Schritt der Signalkaskade wird das Signal also kaum verstärkt. Die hohe Empfindlichkeit des Geruchssinns wird im zweiten Teil der Signalkaskade durch gleichzeitige Aktivierung von zwei Arten von Ionenkanälen erreicht. Zunächst depolarisiert die Zelle durch den Einstrom von  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen, anschließend verstärken die ausströmenden  $Cl^-$ -Ionen die Depolarisation.

Neben dem cAMP-Signalweg existiert in einer Subpopulation von Riechsinneszellen ein alternativer Signaltransduktionsweg (Fulle et al., 1995; Juilfs et al., 1997; Meyer et al., 2000). Diesen Neuronen fehlen zahlreiche Komponenten des klassischen cAMP-vermittelten Signalweges, darunter  $G_{olf}$ , Adenylatzyklase-III und cAMP-gesteuerte CNG-Kanäle. Stattdessen exprimieren sie neben Guanylatzyklase-D (GC-D) auch von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) gesteuerte Phosphodiesterase (PDE2) und CNGA3-Kanäle. Die Funktion dieser besonderen Riechsinneszellen wird noch immer kontrovers diskutiert. Hu et al. konnten die Aktivierung von GC-D positiven Neuronen durch annähernd atmosphärische Konzentrationen an  $CO_2$  zeigen (Hu et al., 2007). Eine andere Arbeit beschreibt dagegen die Detektion natriuretischer Peptide durch GC-D-Neuronen und damit eine mögliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes oder bei der Erfassung von Hunger-, Sättigungs- oder Durstgefühl (Leinders-Zufall et al., 2007).

## 1.2 Das olfaktorische System als Modell neuroentwicklungsbiologischer Elementarprozesse

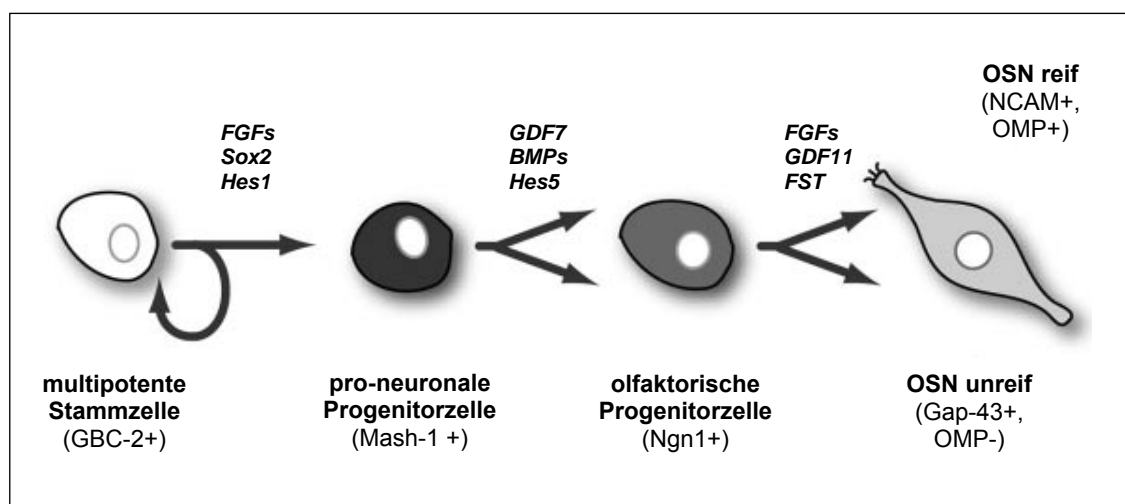
Unter den wenigen Regionen im Nervensystem, die auch im Adultstadium neurogene Aktivität aufweisen, ist das Riechepithel wohl das Gewebe mit der höchsten regenerativen Kapazität. Zeitlebens werden hier apoptotische und nekrotische olfaktorische sensorische Neuronen (OSNs) aus Vorläufer- und Stammzellen nachgebildet. Diese Eigenschaft macht das olfaktorische Neuroepithel zu einem bestens geeigneten Modell für Untersuchungen zur Neurogenese und Differenzierung während der Entwicklung.

Die Ausbildung neuronaler Verschaltungen erfolgt dabei in mehreren zeitlich und räumlich koordinierten Phasen, die sich aufgrund ihrer Abhängigkeit von der elektrischen Aktivität der Neurone in aktivitätsunabhängige und -abhängige Mechanismen unterteilen lassen. Während der Embryogenese werden zunächst unreife Nervenzellen zeitlich gestaffelt in den Keimzonen des Riechepithels gebildet, die anschließend ihre Axone über eine beträchtliche Distanz zu ihren Zielgebieten auf dem *Bulbus olfactorius* projizieren. Dort angekommen, werden initiale synaptische Kontakte mit den M/T-Zellen auf der Ebene sogenannter Proto-Glomeruli geknüpft, die gegebenenfalls später aktivitätsabhängig modifiziert werden. Während der grundlegende Bauplan neuronaler Verbindungen also zunächst aktivitätsunabhängig angelegt wird, erfolgt die spätere synaptische Feinjustierung in Abhängigkeit von elektrischer Aktivität.

### 1.2.1 Neurogenese und Zelldifferenzierung

Neurogenese im olfaktorischen System von Nagern umfasst drei differenzierbare Phasen: a) die embryonale Entwicklung (E10 - P0, primäre Neurogenese), b) die postnatale Expansion (P1 - P30) sowie c) die Erhaltung des adulten *status quo* (P30 - Tod, regenerative Neurogenese). Sie beginnt in der zweiten Trächtigkeitshälfte um den Embryonaltag 10 mit der Verdickung und Invagination der bilateral-symmetrischen olfaktorischen Plakoden. Die posterodorsale Vertiefung des Plakodenepithels differenziert dabei in ein reifes, selbst-regenerierendes sensorisches Epithel mit einer äußerst heterogenen und sich kontinuierlich erneuernden Population von Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen. Horizontale Basalzellen werden hierin als die ruhenden, multipotenten Stammzellen des Riechepithels angesehen. Aus ihnen können alle Zelltypen -auch die bipotenten kugeligen Basalzellen- gebildet werden (Carter et al., 2004; Murdoch und Roskams, 2007). Das embryonale Riechepithel ist zu jedem Zeitpunkt seiner Entwicklung ein hoch dynamisches, sich veränderndes Gewebe. Es enthält Cluster mit basalen Progenitoren sowie Regionen, die ruhend (2 Zelllagen dick), neurogen (Schichten basaler Progenitoren mit unreifen OSNs dazwischen) sowie vollständig entwickeltes

Riechepithel aufweisen, innerhalb derselben Turbinalie (Murdoch und Roskams, 2007). Die primären, multipotenten Progenitorzellen sind neuroepithelialen Ursprungs und erzeugen in basalen Epithelschichten durch Teilung sekundäre Progenitorzellen, die als direkte Vorläuferzellen olfaktorischer Neuronen gelten (Graziadei und Monti Graziadei, 1978). Diese pro-neuronalen Progenitoren exprimieren den *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Transkriptionsfaktor *Mash-1*, der als früher Determinierungsfaktor verschiedener Subpopulationen von olfaktorischen Neuronen gilt (Abb. 1.3). *Mash-1* ist verantwortlich für die Aktivierung einer Reihe von Genen wie Neurogenin1 (*Ngn1*) und *NeuroD*, die wiederum die Differenzierung von olfaktorischen Vorläuferzellen in postmitotische OSNs steuern. So zeigt der *Mash-1*<sup>-/-</sup>-Phänotyp einen signifikanten Verlust basaler Progenitorzellen und in der Folge eine drastische Reduktion olfaktorischer sensorischer Neuronen (Guillemot et al., 1993; Cau et al., 1997; Cau et al., 2002). Postmitotische OSNs (bzw. ihre Somata) steigen schließlich mit zunehmender Reifung und Differenzierung aus den basalen Proliferationszonen in apikale Schichten des Riechepithels auf.



**Abb. 1.3: Neurogenese und Differenzierung olfaktorischer sensorischer Neuronen.** Eine Vielzahl an Signalmolekülen steuert den sequenziellen Prozess der OSN-Entwicklung aus ihren Vorläuferzellen. Modifiziert nach Kawauchi et al. (2004).

Im adulten Riechepithel wird Neurogenese über OSN-abhängige Feedback-Mechanismen reguliert. Reife OSNs produzieren *bone morphogenetic proteins* (BMPs), die zur proteolytischen Degradation von *Mash-1* führen und so die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in den basalen Epithelschichten unterdrücken (Shou et al., 1999). Sterben olfaktorische Neuronen, werden neuronale Progenitoren zur Proliferation angeregt und differenzieren unter anderem als Reaktion auf das wegfallende inhibitorische BMP-Signal, welches normalerweise die Neurogenese unterdrückt (Shou et al., 1999). Eine Vielzahl weiterer Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren der TGF $\beta$ - und Fgf-Familien (Wu et al., 2003; Kawauchi et al., 2005), Transkriptionsfaktoren wie *Lhx2* (Hirota und Mombaerts,

2004) und *Foxg1* (Kawauchi et al., 2009) sowie des *Notch*-Signalweges (*Serrate1*, *Hes1/5*) greifen regulierend in einzelne Schritte sowohl der primären als auch regenerativen Neurogenese ein. Unlängst wurde auch die Beteiligung regulatorischer mikro-RNAs (miRNA) an der terminalen Differenzierung sowie der Aufrechterhaltung der Population olfaktorischer Progenitorzellen beschrieben (Choi et al., 2008). Bei dieser regenerativen Neurogenese bleiben OSN-spezifische Eigenschaften wie die Lage im Epithel und die Rezeptorspezifität der entsprechend des Bedarfs regenerierten Neuronen unverstandener Weise erhalten, wie anhand von Ablationsexperimenten gezeigt wurde (Gogos et al., 2000; Iwema et al., 2004).

Reife, ausdifferenzierte OSNs sind sowohl morphologisch an ihrem Apikaldendriten mit Zilien sowie anhand von Markergenen wie *OMP* (olfactory marker protein) (Farbman und Margolis, 1980) und dem Signaltransduktionsprotein *G<sub>olf</sub>* zu identifizieren. Unreife noch auswachsende OSNs exprimieren hingegen Unreifemarker wie *GAP-43* (growth associated protein) (Verhaagen et al., 1989; Biffo et al., 1990) und *SCG10* (Pellier-Monnin et al., 2001) sowie bereits einen die Spezifität des Neurons definierenden und für den Prozess der Axonlenkung essentiellen Geruchsrezeptor (Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004).

### **1.2.2 Ausbildung der olfaktorischen Projektion: Mechanismen der Axonlenkung**

Erste Geruchsrezeptor exprimierende olfaktorische Neuronen beobachtet man bei der Maus bereits am Embryonaltag 11. In etwa zum gleichen Zeitpunkt findet man auswachsende Axone auf Ebene des Riechepithels, die bereits an E13 als erste Axonfaszikel die Siebbeinplatte passieren und beginnen, den primordialen *Bulbus olfactorius* zu innervieren, indem sie vom rostralen Pol nach dorso-kaudal auf der Bulbus-Oberfläche entlang wachsen. Das Auswachsen von Axonen verschiedener Rezeptorspezifitäten ist dabei zeitlich gestaffelt, so dass beispielsweise Axone von OSNs, die den Geruchsrezeptor mOR256-17 exprimieren, das rostrale Telencephalon an E13, Axone einer anderen Rezeptorspezifität wie P2 (mOR17) (Royal und Key, 1999) oder mOR37 (Conzelmann et al., 2001) den Bulbus nicht vor dem Embryonaltag 14,5-15 erreichen. Axone von OSNs gleichen Rezeptortyps konvergieren schließlich nach Passage der externen Faserschicht vollständig in ihrem Zielglomerulus auf dem Bulbus. Die Trajektorien der Axone olfaktorischer sensorischer Neuronen weisen darauf hin, dass bei der Weg- bzw. Zielfindung im olfaktorischen System direktionale Lenkung eine Rolle spielen muss (Gierer, 1998), andernfalls würden bei nichtdirektionaler Lenkung mäandernde Axone während der Ausbildung der olfaktorischen Projektion vorzufinden sein. Obwohl es verschiedene Erklärungsansätze gibt, wie die Sortierung und Lenkung der mehr als 1000 verschiedenen Axonpopulationen in ihre jeweiligen Zielglomeruli erfolgen

könnte, sind die zentralen Spieler des nicht-topographischen Lenkungsapparates und die genauen Mechanismen der Verdrahtung noch unverstanden.

Ursprünglich wurde angenommen, dass der Geruchsrezeptor eine instruktive Funktion bei der Lenkung olfaktorischer Axone zu ihren jeweiligen Zielgebieten auf dem *Bulbus olfactorius* hat, da eine gezielte genetische Deletion eines Geruchsrezeptors zum Verlust der glomerulären Konvergenz der betreffenden Axone führte (Mombaerts et al., 1996). Bei wechselseitiger Ersetzung verschiedener Geruchsrezeptor-Gene durch einen anderen Geruchsrezeptor konnte zwar eine Rettung der Konvergenz beobachtet werden, die transgenen Axone wurden jedoch daraufhin in einen neuen Glomerulus gelenkt, der weder dem ursprünglichen noch exakt dem neu eingesetzten Rezeptor entsprach (Feinstein und Mombaerts, 2004). Zudem resultierten Mutationen, die einzelne Aminosäuren des Geruchsrezeptorproteins oder dessen Expressionsgrad betrafen, in einer veränderten Aussortierung von Axonen, was oftmals zur Entstehung neuer Glomeruli an anderen Positionen im Bulbus führte (Vassalli et al., 2002; Mombaerts, 2006). Dass auch ein heterolog in ONS exprimierter beta-adrenerger Rezeptor, für den höchst wahrscheinlich kein lenkungsrelevanter Ligand auf dem Wildtyp-Bulbus existieren kann, zur Konvergenz der transgenen Axone in einem definierten Glomerulus führt, ist ein weiteres eindeutiges Argument gegen eine reine rezeptorabhängige Lenkung olfaktorischer Axone (Feinstein et al., 2004). Aus diesen Beobachtungen wurde schließlich ein kontextabhängiges Modell abgeleitet, welches die Sortierung und Konvergenz von Axonen einer Rezeptorspezifität über homophile Axon-Axon-Interaktionen, unterstützt von geruchsrezeptorabhängig exprimierten Adhäsions- und Axonlenkungsmolekülen, erklärt (Vassalli et al., 2002; Feinstein und Mombaerts, 2004; Serizawa et al., 2006). Neben OCAM (olfactory cell adhesion molecule) (Yoshihara et al., 1997) wurden die Adhäsionsmoleküle *Kirrel2* und *Kirrel3* als weitere Kandidatengene identifiziert, die über homophile Interaktion eine „Vorsortierung“ von Axonen gleicher Spezifität bei der glomerulären Konvergenz vermitteln (Serizawa et al., 2006). Aber auch für klassische axonale Lenkungsmoleküle wie die Ephrine und die Eph-Rezeptoren (Cutforth et al., 2003; Serizawa et al., 2006), Semaphorin-3A (Schwartz et al., 2000; Taniguchi et al., 2003; Schwartz et al., 2004) und Neuropilin-1/2 (Cloutier et al., 2002) sowie für Glykoproteine wie BIG-2/contactin-4 (Kaneko-Goto et al., 2008) gibt es Evidenzen, dass sie die korrekte Verdrahtung unterstützen, indem sie wie z.B. im Falle von A-Ephrinen und Eph-A-Rezeptoren über kontaktvermittelte Repulsion Axone unterschiedlicher Rezeptorspezifitäten segregieren. Interessanterweise wird der Expressionsgrad sowohl von *Kirrel 2/3* als auch von Ephrin-A/Eph-A aktivitätsabhängig reguliert. In *CNGA2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit gestörter Signaltransduktion sind die Transkripte für *Kirrel2* und *EphA5* herunter reguliert, die korrespondierenden Transkripte für *Kirrel3* und *Ephrin-A5* dagegen hoch reguliert. Aktivitätsabhängige

Prozesse spielen demnach bereits auf der Ebene der Axonsegregation eine Rolle (Imai et al., 2006; Serizawa et al., 2006).

Das von Feinstein und Mombaerts postulierte kontextabhängige Modell (Feinstein und Mombaerts, 2004) erklärt zwar überzeugend das Phänomen der axonalen Konvergenz, aber nicht die Lenkung auswachsender Axone in ihre Zielgebiete. Die plausibelste Lösung für dieses Lenkungsproblem wäre ein mit einer gegebenen Geruchsrezeptorspezifität koexprimierter „Lenkungsapparat“. Doch wie könnte die wahrscheinlich stochastische Auswahl eines ORs mit der Expression der erforderlichen Qualität oder Quantität an Lenkungsmolekül(en) gekoppelt sein? Am leichtesten könnte man sich vorstellen, dass ausgehend von einem aktivierten OR-Locus ein koexprimiertes Signal die Expression geruchsrezeptorassoziierter Lenkungsmoleküle steuert. Dabei muss der *downstream* vom Geruchsrezeptor liegende Signalweg erkennen, welche Rezeptorspezifität im jeweiligen olfaktorischen Neuron gewählt wurde.

### **1.2.3 Aktivitätsabhängige Prozesse zur Feinjustierung synaptischer Verschaltungen**

Von sensorischen Systemen wie dem visuellen System ist bekannt, dass die Ausbildung axonaler Projektionen während der Entwicklung durch frühe aktivitätsunabhängige Prozesse, gefolgt von der Präzisierung synaptischer Kontakte durch aktivitätsabhängige Prozesse moduliert wird. Neuronale (= elektrische) Aktivität kann dabei spontan oder stimulusabhängig, korreliert oder nicht-korreliert auftreten. Dies geschieht in einer sensiblen Phase mit einer erhöhten neuronalen Plastizität. Im Geruchssystem von Säugern ist die Verbindung zwischen der sensorischen Peripherie und dem Gehirn monosynaptisch. Axone von OSNs projizieren zunächst in die Nähe ihres späteren Zielglomerulus und scheinen eine entscheidende Rolle bei der Organisation der Projektionen der nachgeschalteten Interneuronen zu spielen (Malun und Brunjes, 1996). Die dendritischen Verzweigungen der Mitralzellen, welche die primären Efferenzen des olfaktorischen Bulbus darstellen, greifen zunächst die Information mehrerer Glomeruli und demnach verschiedener Rezeptorspezifitäten ab. Solche transienten, heterogenen Innervationen bilden sich normalerweise innerhalb der ersten postnatalen Tage (P1-P7) zu einem einzelnen, monoglomerulären Primärdendriten zurück. Dieses „Fein-Tuning“ der olfaktorischen Verschaltungen benötigt zumindest zu einem gewissen Teil sensorischen Input (Zou et al., 2004). Die Blockierung der olfaktorischen Signaltransduktion durch *knock-out* der CNGA2-Untereinheit des zyklisch-nukleotid-gesteuerten Ionenkanals führte zu Abweichungen von der korrekten axonalen Verdrahtung für M72-Glomeruli, wohingegen die Glomeruli des Geruchsrezeptors P2 normal ausgebildet waren in CNGA2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Lin et al., 2000; Zheng et al., 2000). Die Präzisierung dendritischer Verzweigungen von

Mitralzellen war zwar signifikant verzögert in den aktivitätsdefizienten CNGA2<sup>-/-</sup>-Mäusen, erreichte aber schließlich doch das Projektionsmuster von Wildtyp-Tieren (Lin et al., 2000). Nach konditioneller Expression von Tetanustoxin (leichte Kette) in OSNs zur Inhibierung der synaptischen Transmitterfreisetzung konnte kein Effekt auf das axonale Targeting beobachtet werden, jedoch waren Tetanustoxin exprimierende Neuronen in einem kompetitiven Umfeld nicht in der Lage, ihre korrekten synaptischen Verbindungen aufrechtzuerhalten und degenerierten. Inwiefern stimulus-unabhängige, spontane Aktivität, die bei OSNs beobachtet wird (Rospars et al., 1994), Einfluss auf diese Prozesse hat, wurde durch Überexpression des Kir2.1-Kanals in OSNs analysiert. Die hyperpolarisierten Neuronen zeigten eine deutlich verzögerte und z.T. sehr unpräzise multiglomeruläre Innervation (Yu et al., 2004). Für Geruchsrezeptor-Proteine mit hoher Sequenzidentität wie die Mitglieder der mOR37-Subfamilie, die auf direkt benachbarte Glomeruli auf dem Bulbus projizieren, könnten aktivitätsabhängige Mechanismen eine besondere Rolle bei der Axonsegregation in individuelle Glomeruli spielen. Axone verschiedener mOR37-exprimierender Neuronen innervieren zwischen E15 und P0 als Mischpopulation einen kleinen Bereich im Bulbus, der den späteren mOR37-Glomeruli entspricht. Während einer sehr kurzen postnatalen Phase segregieren die einzelnen Axonpopulationen in separate protoglomeruläre Strukturen (Conzelmann et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt scheinen gerade die erste Exposition olfaktorischer Neuronen mit Duftstoffen sowie die differenzielle, stimulus-abhängige Aktivität diesen „*refinement*“-Prozess glomerulärer Projektionen voranzutreiben (Reed, 2003). Am Beispiel der mOR37-Glomeruli wurde zudem gezeigt, dass die letztendlichen Positionen individueller Glomeruli zueinander nicht fix sind, sondern lokale Permutationen, d.h. geringe Positionsabweichungen benachbarter Glomeruli zeigen (Strotmann et al., 2000).

### **1.3 Bedeutung nicht-kodierender RNAs bei der Steuerung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen**

Untersuchungen der letzten Jahre belegen, dass eine Vielzahl bisher unbekannter nicht-kodierender RNA-Spezies (ncRNA) existiert mit wichtigen Funktionen u.a. bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen. Regulatorische Netzwerke von funktionellen ncRNAs steuern dabei zelltypspezifisch globale Prozesse wie die Regulation des Chromatinstatus, Transkription, Translation, Prozessierung und Stabilität von mRNA (Costa, 2007). Die gegenwärtige Unterteilung protein-kodierender und nicht-kodierender Sequenzen im Genom erfolgt auf Basis von Präsenz oder Abwesenheit offener Leseraster mit bekannten und gut charakterisierten Intron-Exon-Strukturen. Mit der vollständigen

Sequenzierung des menschlichen Genoms stellte sich jedoch heraus, dass von den etwa drei Milliarden Basenpaaren der genomischen DNA nur 1-2 % als Vorlage für die Herstellung von Proteinen genutzt werden. Der verbleibende, nicht-kodierende „Rest“ von 98-99 %, der in der Vergangenheit zu Unrecht als "evolutionärer Abfall" oder „Junk-DNA“ bezeichnet wurde, besteht hauptsächlich aus Introns, die innerhalb protein-kodierender Transkripte und den intergenischen Regionen, die dazwischen liegen (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Diese nicht-kodierenden Regionen können Baupläne für polyadenylierte und nicht-polyadenylierte nicht-kodierende RNA-Transkripte enthalten (Cheng et al., 2005; Willingham und Gingeras, 2006), von denen ein Großteil als stabile poly(A)-RNAs vor allem während der Zelldifferenzierung und Entwicklung im Zytosol vorliegt (Kapranov et al., 2002; Cawley et al., 2004). Zur heterogenen Gruppe der nicht-kodierenden RNAs zählen sieben funktionelle ncRNA-Klassen: die bekannteren RNA-Spezies wie ribosomale (rRNA) und Transfer-RNA (tRNA), small nuclear (snRNA) und small nucleolar RNA (snoRNAs), kleine RNAs wie microRNA (miRNA), Piwi-interacting RNA (piRNAs) sowie lange ncRNAs. All diese regulatorischen RNA-Spezies werden im Gegensatz zu den mRNAs nicht in Proteine übersetzt, sondern sind bereits auf RNA-Ebene aktiv.

Neben kleinen regulatorischen RNAs wie den miRNAs, die im olfaktorischen System an der terminalen Differenzierung olfaktorischer Vorläuferzellen beteiligt sind (Choi et al., 2008), belegen aktuelle Untersuchungen zudem die Existenz hoch konservierter, langer ncRNAs mit Größen von ~300 Nukleotiden (nt) bis über 10 Kilobasen (kb). Diese langen nicht-kodierenden RNAs kommen als gespleißte und polyadenylierte RNAs in annähernder wenn nicht sogar größerer Zahl und Vielfalt wie protein-kodierende mRNAs in verschiedenen Zellpopulationen vor (Bertone et al., 2004; Kapranov et al., 2005; Rinn et al., 2007; Guttman et al., 2009). Gegenwärtig sind für Säuger lediglich ein Dutzend solcher langen ncRNAs funktionell relativ gut charakterisiert. Darunter finden sich Funktionen wie die Inaktivierung X-chromosomaler Gene zur Dosis-Kompensation durch *Xist* und *Tsix* ncRNAs (Brown et al., 1991; Lee et al., 1999), die genomische Prägung (Imprinting) von Genen durch die *Airn* ncRNA über eine Expressionsverschiebung hin zum maternalen Allel (Sleutels et al., 2002; Latos et al., 2009), die Regulation des *HoxD*-Gens in *trans* durch die 40 kb entfernt lokalisierte *HOTAIR* ncRNA (Rinn et al., 2007) oder die Steuerung des nukleären Transports von Kernproteinen durch die *Nron* ncRNA (Willingham et al., 2005). Mercer et al. identifizierten kürzlich 849 ncRNAs, die im adulten Hirn der Maus zelltypspezifisch sowie spezifisch in einzelnen subzellulären Kompartimenten z.B. von Purkinje-Zellen exprimiert sind und sehen ihre Bedeutung in der Regulation angrenzender, z.T. neurologisch relevanter Protein-kodierender Gene bzw. Gencluster (Mercer et al., 2008). Die für zwei lange ncRNAs kodierenden Gene *HAR1F* und *HAR1R* (HAR: human



accelerated region) sind beispielsweise in einem ganz engen Zeitfenster während der humanen Kortextentwicklung in Cajal-Retzius-Neuronen exprimiert und wahrscheinlich an der Regulation von Zelldeterminierung und radialer Migration beteiligt (Pollard et al., 2006). Bezogen auf ihre Lage im Genom können verschiedene nicht-kodierende RNAs über *cis*- und *trans*-regulatorische Wirkmechanismen die Expression benachbarter aber auch weit entfernter Genloci steuern (Kapranov et al., 2007). Es wird geschätzt, dass Säuger nur etwa 20.000 protein-kodierende Gene, aber möglicherweise bis zu 40.000 ncRNAs besitzen (Carninci et al., 2005). Man geht heute davon aus, dass der Unterschied zwischen Lebewesen nicht auf der Anzahl ihrer Gene, sondern vielmehr auf der Funktionalität und Wechselwirkung von nicht-kodierenden RNAs mit dem Genom - einer Art „Regulatom“ bzw. „Interactom“ - beruht.

## 1.4 Zielstellung und experimentelle Strategie

Riechsinneszellen verschiedener Rezeptor-Spezifitäten projizieren an verschiedene Zielorte im *Bulbus olfactorius* und müssen sich demzufolge in ihrem Lenkungsapparat qualitativ oder quantitativ unterscheiden. Wenn der die Spezifität bestimmende Geruchsrezeptor -wie beschrieben- nicht gleichzeitig als Axonlenkungsrezeptor fungiert, muss mit jedem Geruchsrezeptor ein anderer spezifischer Lenkungsapparat streng koexprimiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, potenzielle geruchsrezeptor-assoziierte und damit spezifitätsabhängig exprimierte Differenzierungsmoleküle (u.a. eventuell „Verdrahtungsmoleküle“) in individuellen unreifen, sich „verdrahtenden“, aber bereits OR-exprimierenden olfaktorischen sensorischen Neuronen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wird eine transkriptomtreue Einzelzell-cDNA-Bibliothek aus einem Pool unreifer olfaktorischer Neuronen gleichen Rezeptortyps (mOR37B) hergestellt und mittels doppelt-differenziellem radioaktiven Screening, welches Transkripte *reifer* OSNs gleicher Spezifität sowie unreifer OSNs beliebig anderer Spezifität „subtrahieren“ soll, analysiert. Die Identifizierung von olfaktorischen Neuronen gleicher Spezifität wird dabei durch Verwendung transgener Mäuse, die EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) zusammen mit dem Geruchsrezeptor mOR37B koexprimieren (Strotmann et al., 2000), ermöglicht. Ihre Isolierung erfolgt mikromanipulatorisch und nicht-automatisiert. Zur Erhaltung der quantitativen Repräsentation des Einzelzell-Transkriptoms soll ein für die Synthese und Klonierung von Einzelzell-cDNA optimiertes Protokoll entwickelt werden. Folglich werden differenzielle Transkripte erwartet, die spezifisch für auswachsende unreife Neuronen der untersuchten mOR37B-Rezeptorspezifität sind und in Zusammenhang mit ihrer finalen Differenzierung (z.B. spezifischen Axonlenkung) stehen. Diese durch die

---

beschriebene Screening-Strategie identifizierten Moleküle werden schließlich final hinsichtlich ihrer Expression im sich entwickelnden olfaktorischen System mittels *in-situ*-Hybridisierung validiert.

Die Ergebnisse dieser einzelzellbasierten Transkriptomanalyse sollen zum besseren Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen beitragen, die bei der spezifitäts-abhängigen Differenzierung des sich entwickelnden olfaktorischen Systems von Säugern eine Rolle spielen.

## 2. MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden transgene Mäuse (*Mus musculus*) aus einem gemischten 129/Sv x C57BL/6-Hintergrund verwendet. *OMP-GFP*-Mäuse, die GFP an Stelle von OMP unter der Kontrolle des endogenen OMP-Promotors exprimieren (Potter et al., 2001) sowie *mOR37B-EGFP*-Mäuse, die EGFP vermittelt durch eine IRES-Sequenz zusammen mit dem endogenen Geruchsrezeptor mOR37B coexprimieren (Strotmann et al., 2000), wurden von Dr. Jörg Strotmann (Universität Hohenheim, Stuttgart) bzw. Prof. Dr. Peter Mombaerts (MPI für Biophysik, Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. Die Haltung erfolgte unter Standard-Mauszuchtbedingungen in einem 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus bei konstanter Temperatur (21°C) und mit Zugang zu Futterpellets und Trinkwasser *ad libidum*.

#### 2.1.2 Bakterien

Bakterien des Stammes *E.coli* XL-1 Blue MRF' (Stratagene) wurden zur Herstellung der Einzelzell-cDNA-Bibliotheken sowie für alle weiteren Klonierungen verwendet. XL1-Blue MRF' elektrokompente Zellen sind Tetracyclin-resistent, defizient in allen bekannten *E. coli* K12 Restriktionssystemen ( $McrA^-$ ,  $McrCB^-$ ,  $McrF^-$ ,  $Mrr^-$ ,  $HsdR^-$ ) sowie defizient für Endonuklease (*endA*) und Rekombination (*recA*). Das *lacIqZΔM15*-Gen auf dem F'-Episom ermöglichte ein blue/white-Screening rekombinanter Plasmide.

### 2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die verwendeten und im Folgenden beschriebenen Methoden entstammen, soweit nicht anders angegeben, den Laborhandbüchern "Molecular cloning: a laboratory manual" von Sambrook et al. (2001) und "Current Protocols in Molecular Biology" von Ausubel et al. (1992ff).

Arbeiten mit RNA wurden strikt unter Ribonuklease (RNase)-freien Bedingungen durchgeführt. RNase-freie Flüssigkeiten wurden durch Behandlung mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC; 30 min Rühren bei RT) und anschließendes Autoklavieren (120°C, 20 min) hergestellt. Starke Nukleophile enthaltende und dadurch nicht mit DEPC behandelbare Lösungen wurden unter RNase-freien Bedingungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Glas- und Metallgeräte wurden zur RNase-Dekontamination für 5 h bei 180°C gebacken, des Weiteren wurden sterile Einweg-Materialien verwendet.

### 2.2.1 Kultivierung transformierter E.coli-Bakterien

Bakterien des tetracyclinresistenten Stammes *E.coli* XL-1 Blue MRF', nach Transformation mit Konstrukten des Vektors pBluescript I KS zusätzlich ampicillinresistent, wurden in LB<sup>Amp</sup>-Flüssigmedium bzw. auf LB<sup>Amp</sup>-Agarplatten kultiviert. Zur Plasmidpräparation im Mini-Maßstab (bis 20 µg) wurden Bakterien in 5 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Anlegen einer Glycerindauerkultur (130 µl Bakteriensuspension + 870 µl steriles Glycerin, Lagerung: -80°C) wurde die restliche Flüssigkultur durch Zentrifugation (10000 rpm, 60 s, RT, MiniSpin) pelletiert. Für Maxi-Präparationen (bis 500 µg Plasmid) wurden 250 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium mit 1 ml einer 5 ml-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C für ca. 8 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei RT und 6000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0 R, Ausschwingrotor).

### 2.2.2 Präparation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### Plasmidisolierung

##### *Alkalische Lyse*

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der QIAprep Spin Mini Kit (bis 20 µg, Qiagen) bzw. der Plasmid Maxi Kit (bis 500 µg, Qiagen) eingesetzt und nach Herstellerangaben verfahren. Basierend auf der Methode der alkalischen Lyse wurden genomische DNA und Proteine aus dem alkalischen Lysat nach Neutralisierung mit Kaliumacetat gefällt und bakterielle RNA durch gleichzeitigen RNase-Verdau entfernt. Die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA wurde anschließend durch Säulenchromatographie über Silikagel isoliert. Nach Fällung mit Isopropanol wurde die gewonnene Plasmid-DNA in einem entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

##### *Kochlyse und Fällung mittels N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)*

Für analytische Zwecke wurden die Bakterien analog 2.2.1 kultiviert und pelletiert (1 min, 10000 rpm, RT; Minispin, Eppendorf). Nach Resuspension in 200 µl STET-Puffer (8 % Saccharose, 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100) erfolgte die Lyse durch Zugabe von 10 µl Lysozym-Lösung (50 mg/l in H<sub>2</sub>O) für 5 min bei RT. Durch anschließendes Kochen (90 s, 100°C) wurden Proteine und genomische DNA denaturiert, als Zelldebris pelletiert (10 min, 13000 rpm, RT; Minispin) und verworfen. Die im klaren wässrigen Überstand noch vorhandene bakterielle RNA wurde mit 10 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O, DNase-frei durch 30-minütiges Kochen) für 10 min bei 68°C verdaut und die Plasmid-DNA im Anschluss mit 10 µl CTAB-Lösung gefällt (5 % w/v in 0,5 M NaCl; 3 min RT). Der pelletierte Niederschlag (5 min, 13000 rpm, RT; Minispin) wurde in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst, die Plasmid-DNA durch Ethanol-fällung isoliert und in 30 µl TE-Puffer

(pH 8,0) aufgenommen. Die Proben wurden spektrophotometrisch vermessen und anschließend bei -20°C gelagert.

### **Präparation von Gesamt-RNA**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus olfaktorischem Epithel wurde TRIzol-Reagenz (Invitrogen), eine monophasische Lösung aus Phenol, Guanidin-Isothiocyanat und Wasser, verwendet. Das Gewebe wurde direkt nach der Präparation (siehe 2.3.1) mit frischem HBSS gespült, in einen Potter-Homogenisator mit 1 ml TRIzol-Reagenz überführt und sofort homogenisiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA nach Herstellerangaben isoliert. Luftgetrocknete RNA wurde in RNase-freiem TE-Puffer (pH 7,4) aufgenommen und zur vollständigen Lösung 10 min bei 55°C erhitzt und mehrfach resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels optischer Dichtemessung bei 260 nm am Spektralphotometer bestimmt. Qualität und Integrität wurden im denaturierenden Agarose-Gel kontrolliert. RNA wurde stets bei -80°C gelagert.

### **Ethanol-fällung**

Ein Volumenanteil nukleinsäurehaltiger Lösung wurde mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (DNA) bzw. 4 M Lithiumchlorid (RNA) sowie 2,5 Volumenanteilen Ethanol (absolut, -20°C) versetzt und mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Das DNA- bzw. RNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei höchster Umdrehungszahl abgeschieden und in 75 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurde das Nukleinsäure-Pellet in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer gelöst.

### **Phenol-Extraktion**

Extraktionen mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (PCI; v/v/v = 25:24:1; TE-gesättigt; pH 7,5) und Chloroform wurden zur Entfernung von Proteinrückständen aus DNA-haltigen Lösungen durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit einem äquivalenten Volumen des PCI-Gemisches versetzt, 30 s kräftig geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut extrahiert. Nach darauf folgender zweimaliger Extraktion mit Chloroform wurde die DNA durch Ethanol-fällung präzipitiert. Bei geringen Ausgangsvolumina wurde Phase Lock Gel™ heavy (Eppendorf) für eine bessere quantitative Abtrennung der wässrigen Phase eingesetzt.

## 2.2.3 Synthese von Nukleinsäuren

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### *Standard-PCR*

Routinemäßige Amplifikationen von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden unter Standard-Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das gereinigte DNA-Template wurde im pg- (Plasmid) bis ng-Maßstab (cDNA) eingesetzt und in einem Ansatz aus 1x PCR-Puffer (67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 % Tween 20; Genaxxon bioscience), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , je 200  $\mu\text{M}$  dNTP, je 20 pmol Primer (Tab. 1, Anhang II) und 0,05 - 0,1 U/ $\mu\text{l}$  HotStart Taq-DNA-Polymerase (Genaxxon bioscience) amplifiziert. Dabei wurde das Enzym zunächst durch Hitze-Inaktivierung des monoklonalen HotStart Taq-Antikörpers (2 min, 95°C) freigesetzt und die Template-DNA im Anschluss über 35 Zyklen (45 s bei 94°C Denaturierung, 45 s bei 1-3°C unter der niedrigsten Primer-Schmelztemperatur, 45 s bei 72°C Elongation) amplifiziert. Nach einer optionalen finalen Elongation (5 min 72°C) wurde auf 4 °C abgekühlt und die Proben im Agarose-Gel analysiert. Das Primerdesign erfolgte unter Verwendung der Programme Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) und NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Alle verwendeten Primer mit ihren Kennwerten sind Tab. 1 (Anhang III) zu entnehmen.

#### *Colony-PCR*

Eine erfolgreiche Klonierung von DNA-Fragmenten in den pBluescript I KS-Vektor wurde über die Amplifikation der Inserts zwischen den die *multiple cloning site* (MCS) flankierenden T3- und T7-Primerbindungsstellen nachgewiesen. Dazu wurden einzelne Kolonien in je 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium suspendiert und je 1  $\mu\text{l}$  davon in einem PCR-Mix (s. Standard-PCR) mit 20 pmol T3- und T7-Primer (Tab. 1, Anhang III) über 35 Zyklen (Annealing bei 56°C) amplifiziert. Als Referenzen dienten eine Positivkontrolle mit bekanntem Insert sowie pBluescript I KS-Vektor als Negativkontrolle.

### Reverse Transkription (RT)

Die Synthese von Erst-Strang-cDNA durch reverse Transkription erfolgte ausgehend von 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, die zuvor durch Behandlung mit RNase-freier DNase I (0,07 Kunitz-Einheiten/ $\mu\text{l}$ , 10 min, RT; Qiagen) von Kontamination mit genomischer DNA befreit wurde. RNA und 20 pmol genspezifischer 3'-Primer bzw. 100 pmol Random-Hexamere wurden zunächst 5 min bei 70°C denaturiert. In Gegenwart von Transkriptionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT), je 1 mM dNTP, 1 U/ $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (RiboLock, Fermentas) und 10 U/ $\mu\text{l}$  Reverser Transkriptase (RevertAid™ H Minus M-MuLV, Fermentas) erfolgte für 5 min bei 37°C das Primer-Annealing (5 min, 25°C bei Random-Hexameren) und im Anschluss die cDNA-Synthese für 60 min bei 42°C. Nach Abstoppen der Reaktion (10 min, 70°C) wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

### **Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden durch *in-vitro*-Transkription (IVT)**

Die Herstellung und gleichzeitige Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin (DIG) erfolgte über den Einbau von DIG-UTP während der *in-vitro*-Transkription (IVT). Es wurden Sonden aus dem 3'-nichttranslatierten Bereich der cDNA-Sequenzen für beta-Actin (NM\_007393.1), OMP (NM\_011010.2), Golf (BC\_078439.1), Olf-1 (AK\_035781.1), Gap-43 (NM\_008083.2), Tubb3 (NM\_023279.2), SCG10/Stmn2 (NM\_025285.2), Gng8 (NM\_010320.3), Tmsb10 (NM\_025284.3) und ncRNA hergestellt (Tab. 2, Anhang II).

Für antisense-Sonden wurden zunächst 50 ng/µl Plasmid auf der 5'-Seite des Inserts mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease linearisiert (2 h, 37°C, 10-facher Überverdau) und gegebenenfalls glatte DNA-Enden (*blunt ends*) durch Zugabe von dNTPs (je 100 µM) und T4-DNA-Polymerase (1 U/µg DNA, Fermentas) erzeugt (20 min 11°C, 10 min 65°C). Nach Aufreinigung über eine Säule (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) wurde 1 µg Plasmid im 20 µl-Ansatz in Gegenwart von Transkriptionspuffer (1x, Fermentas), DIG-Ribonukleotid-Mix (1x DIG-RNA-Labeling Mix, Roche) und RNase-Inhibitor (1 U/µl, Fermentas) mit Hilfe von T3- bzw. T7-RNA-Polymerase (2 U/µl, Fermentas) transkribiert. Durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA; pH=8.0 wurde die Reaktion abgestoppt und die entstandene DIG-markierte RNA-Sonde nach Fällung mit 4 M LiCl und absolutem Ethanol (-20°C, >1 h) in TE aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die durchschnittliche Ausbeute lag bei 15-20 µg RNA-Sonde/µg eingesetztem Plasmid.

### **2.2.4 Qualitative und quantitative Analyse von Nukleinsäuren**

#### **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung**

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde mit einem Spektralphotometer (WPA Biowave S2100, Biochrom) bestimmt. Dazu wurde die DNA- bzw. RNA-Lösung in Wasser oder TE verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) und 280 nm ( $OD_{280}$ ) ermittelt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg RNA pro ml Lösung. Der  $OD_{260}/OD_{280}$  - Quotient wurde als Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung herangezogen und lag mit 1,8-2,0 im Optimum.

#### **Agarose-Gelelektrophorese**

Für analytische und präparative Zwecke wurde DNA bzw. RNA im Agarosegel ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Trennproblem wurden 0,5 -2 %ige Agarose-Gele in TAE- bzw. TBE-Puffer verwendet. Sollten die Nukleinsäuren nach der Elektrophorese auf Nylonmembranfilter transferiert und mit Digoxigenin-markierten Sonden hybridisiert werden, so wurde strikt auf die Kompatibilität von Agarose und Membran geachtet, um unerwünschte Hintergrundbildung durch Übertragung von sondenbindenden Komponenten aus der Agarose auf den Membranfilter zu vermeiden (Weth, 1993). Hierfür

bewährt hat sich die Agarose (LE, Analytical Grade; #V3121) von PROMEGA. Alle Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen 10x Ladepuffer (Endkonz. 1x) versetzt und bei einer Feldstärke von 5-7 V/cm aufgetrennt. RNA-Proben wurden zuvor in 50 % Formamid denaturiert (3 min 99°C, danach auf Eis). Als Referenz wurden 0,7 µg DNA-Leiter (1 kb Plus, Invitrogen) bzw. 1 µg RNA-Leiter (peqGOLD High Range, peqLab) aufgetragen. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml in TBE, 15 min) und anschließendem Entfärben (15 min, in TBE) erfolgte die Detektion der Nukleinsäure-Banden unter UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) und die Dokumentation mittels Fotografie (BioDocAnalyse, Biometra).

### **Nukleinsäure-Blotting**

Northern- bzw. Southern-Blotting ermöglicht eine qualitative und semiquantitative Analyse von elektrophoretisch getrennten RNA- bzw. DNA-Molekülen nach ihrem Transfer vom Agarosegel auf eine Nylonmembran (Blotting). In der vorliegenden Arbeit fand das Kapillarblotting als Transfermethode Anwendung. Unterschiede beider Varianten finden sich in der Probenvorbereitung und der Gelelektrophorese.

#### *Northern-Blot*

Einzelsträngige RNA bildet durch intra- und intermolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen und Aggregate aus, die das Laufverhalten der RNA im Gel negativ beeinflussen und verfälschen. Eine korrekte Analyse von RNA ist demzufolge nur in denaturierenden Gelen möglich, da hier die Sekundärstrukturbildung durch Aufheben von Wasserstoffbrückenbindungen verhindert wird (Lottspeich, 2006). Als denaturierendes Agens wurde hier Formaldehyd verwendet.

Nach Denaturierung (15 min, 55°C; abkühlen auf Eis) in 50 % Formamid und 2 % Formaldehyd wurden je 5 µg totale RNA/Spur im Formaldehyd-Agarosegel (0,7 % Promega-Agarose; 0,5 % Formaldehyd) bei einer Spannung von 2-4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. MOPS-Puffer mit 0,5 % Formaldehyd wurde als Laufpuffer verwendet. Als Längenstandard diente ein RNA-Marker (peqGOLD High Range, peqlab), der vor dem Blotten abgetrennt und nach Anfärben im Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml in TBE-Puffer) und Entfärben in TBE fotografiert wurde (BioDocAnalyse, Biometra). Vor dem Transfer von RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) wurde das Agarosegel zur Entfernung des Formaldehyds für 20 min in Transferpuffer (1 M Ammoniumacetat) equilibriert. Im Anschluss wurde eine Abwärtstransfer-Pyramide (Chomczynski, 1992) aufgebaut und für 2h bei RT mit Transferpuffer geblottet. Nach Markierung der Geltaschen folgte die Fixierung der RNA an den Membranfilter durch UV-Bestrahlung (1 min, Transilluminator, Biometra) und die Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden.



### *Southern-Blot*

Alle Einzelzell-cDNAs (siehe 2.3.2) wurden unmittelbar nach der PCR-Amplifikation durch den Nachweis der Expression von zelltyp- und reifegradspezifischen Genen charakterisiert. Je 4 µl cDNA wurde im 0,7 %igen Agarose-Gel (Promega-Agarose) in TBE-Puffer bei 5 V/cm aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur partiellen Depurinierung der enthaltenen cDNA 5 min in 0,25 M HCl und zur Erzeugung von Strangbrüchen an den depurinierten Stellen sowie zur Denaturierung 2 x 15 min in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl inkubiert. Danach wurde 2 x 15 min in 1 M Ammoniumacetat umgepuffert und das Kapillarblotting analog zum Northern-Blot durchgeführt. Die cDNA wurde schließlich durch UV-Bestrahlung auf dem Filter fixiert und mit antisense-RNA-Sonden hybridisiert.

### **Nicht-radioaktive Filterhybridisierung**

#### *Hybridisierung*

Für alle nicht-radioaktiven Filterhybridisierungen wurden mit Digoxigenin markierte antisense-RNA-Sonden unter stringenten<sup>4</sup> Hybridisierungsbedingungen verwendet. Die Schmelzpunkte ( $T_m$ ) von DNA:DIG-RNA- sowie RNA:DIG-RNA-Hybriden wurden nach den in Tabelle 3 (s. Anhang III) angegebenen Formeln berechnet. Diese beruhen auf Formeln zur Berechnung der Schmelztemperatur von Hybriden mit radioaktiv markierten antisense-RNA-Sonden (Wahl et al., 1987) und sind durch Erweiterung um den Term  $-12,5^\circ\text{C}$  zur Berechnung der Schmelztemperatur von digoxigeninmarkierten Sonden geeignet, die entsprechend erniedrigt ist. Für die Wahl der Hybridisierungstemperatur wurde berücksichtigt, dass sich die Schmelztemperatur mit jedem Prozent Sequenzabweichung zwischen Sonde und Zielsequenz um etwa  $0,75^\circ\text{C}$  reduziert (Weth, 1993).

Die auf Membranfiltern immobilisierten Nukleinsäuren wurden zunächst für 1-2 h bei Hybridisierungstemperatur in Hybridisierungslösung (Standard: 5x SSC, 50 % Formamid, 0,5 % SDS, 5x Denhardt's Reagenz) prähybridisiert. Anschließend wurde über Nacht in Gegenwart von 30-50 ng/ml Sonde in Hybridisierungslösung hybridisiert. Die Sonden wurden zuvor in 50 % Formamid denaturiert (3 min,  $100^\circ\text{C}$ ) und auf Eis abgeschreckt. Die sondenspezifischen Hybridisierungstemperaturen sind Tab. 2 (s. Anhang III) zu entnehmen. Nach der Hybridisierung wurde zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonde 2 x 10 min bei Hybridisierungstemperatur mit Hybridisierungslösung und 2 x 15 min mit  $0,1 \times \text{SSC}$ / 0,1 % SDS ebenfalls bei Hybridisierungstemperatur gewaschen.

---

<sup>4</sup> Die Stringenz der Hybridisierung bestimmt sich durch die Differenz zwischen Schmelzpunkt des Hybrids ( $T_m$ ) aus Sonde und Zielsequenz und der verwendeten Hybridisierungstemperatur ( $T_H$ ), wobei ein großes  $\Delta T$  niedrige Stringenz bedingt.

### *Detektion der Hybride und densitometrische Auswertung*

Die Bindung der Sonden an ihr komplementäres Target wurde durch Umsetzung des Chemilumineszenz-Substrates CDP-*Star* (2-Chloro-5-(methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decan}-4-yl) phenylphosphat, Dinatriumsalz, Roche Diagnostics) durch die an anti-DIG-Fab-Antikörperfragmente gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen. Nach dem stringenten Waschen wurde die Membran kurz in Wasch-Puffer (0,3 % w/v Lauroylsarcosin in MaBS) bei RT equilibriert und danach für 1 h in Blockierungslösung (1 % w/v Blocking-Reagenz in MaBS) blockiert. Anschließend wurde für 30 min mit anti-DIG-AP Fab-Fragmenten (Roche Diagnostics; 0,1 U/ml in 1 % Blocking-Reagenz) inkubiert und überschüssiger Antikörper mit Wasch-Puffer (3 x 10 min, RT) entfernt. Die Substratreaktion erfolgte schließlich nach kurzem Umpuffern in Reaktionspuffer durch Zugabe von CDP-*Star* (1:500 in Reaktionspuffer, pH 9,5). Nach 5-minütiger Inkubation wurde der in Folie verpackten Membran ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) exponiert, der durch die Chemilumineszenz des Reaktionsproduktes an spezifischen Stellen geschwärzt wurde. Die Filme wurden per Hand entwickelt (Entwickler D19 und Fixierer, Kodak) und photographisch dokumentiert (BioDocAnalyse, Biometra). Es folgte die densitometrische Auswertung der Banden durch Bestimmung der optischen Dichte pro Flächeneinheit [OD/mm<sup>2</sup>] mit den Funktionen *Area* bzw. *Integrated Density* des Programms ImageJ (Version 1.33u, NIH, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## **2.2.5 Enzymatische Manipulation von DNA**

### **Klonierung von DNA-Fragmenten**

#### *Vektorpräparation*

Vektor-DNA wurde für 2 h mit einem Überschuss des entsprechenden Restriktionsenzym (5-10 Units/ $\mu$ g Plasmid-DNA) bei 37°C in geeignetem Puffer linearisiert, für 30 min bei 37°C mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) bzw. 60 min bei 37°C mit CIP (Calf Intestine Phosphatase) dephosphoryliert, der Ansatz thermisch inaktiviert (15 min, 65°C) und über eine Säule (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) aufgereinigt. CIP wurde aufgrund schlechter thermischer Inaktivierbarkeit durch Extraktion mit PCI (s. 2.2.2) und anschließende Säulen- Aufreinigung entfernt.

#### *Präparation von Insert-DNA*

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Primern mit Restriktionsschnittstellen (Tab. 1, s. Anhang III) mittels PCR ausgehend von cDNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Um in den Vektor pBluescript I KS (Stratagene) zu klonieren, wurden die PCR-Fragmente analog zum Vektor

mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und über eine Säule aufgereinigt.

### Ligation

Für Standard-Ligationen wurden Insert und Vektor in einem Stoffmengenverhältnis von 3:1 eingesetzt und in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (40 celu/µl, NEB) in Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, 25 µg/ml BSA, pH 7.5 bei 25°C) über Nacht bei 4°C ligiert.

## 2.2.6 Transformation durch Elektroporation

### Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden Vorkulturen von *E.coli* XL-1 Blue MRF' (Stratagene) in 5 ml LB<sup>Tet</sup>-Medium (50 µg/ml Tetracyclin) angesetzt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Eine 5 ml-Starterkultur wurde in 500 ml LB<sup>Tet</sup>-Medium überimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 (Spektrophotometer WPA Biowave, Biometra) kultiviert. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und die Bakterien in der Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments GmbH) pelletiert (5000 rpm, 4°C, 5 min). Alle weiteren Schritte wurden unter Vermeidung erneuter Erwärmung durchgeführt. Nacheinander wurden die Bakterien durch sanfte Resuspension und Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4°C) zweimal in sterilem Wasser und einmal in 10 % Glycerin gewaschen. Schließlich wurden die Bakterien in 10 % Glycerin resuspendiert (1 ml für 500 ml Kultur), aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Mit einem Aliquot wurde die Kompetenz der Bakterien (cfu/µg Plasmid) vor dem Einfrieren durch Transformation von 1ng *supercoiled*-Plasmid ermittelt.

### Elektroporation

Für die Elektrotransformation wurde 1 ng Plasmid-DNA zu 50 µl elektrokompetenten Bakterien auf Eis gegeben, in eine vorgekühlte Küvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt und bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm im Elektroporator transformiert. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und zur Expression der Ampicillin-Resistenz für 30 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden je 100 µl geeigneter Verdünnungen der Bakterienkultur auf LB<sup>Amp</sup>-Bakterienagarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.3 Herstellung und Screening von 3'-cDNA-Tag-Bibliotheken aus Einzelzellen

### 2.3.1 Gewinnung einzelner Riechsinneszellen

#### Gewebepräparation

Zur Präparation des Riechepithels von mOR37B-EGFP- und OMP-GFP-Mäusen wurden die Tiere am Postnataltag 7-8 (P7/8; Tag der Geburt: P0) durch Dekapitieren getötet. Der Schädel wurde nach Entfernen der Haut sagittal entlang der Mittellinie mit einem Skalpell halbiert, das Hirn einschließlich der *Bulbi olfactorii* entfernt und das Präparat sofort in eiskaltem HBSS gespült. Alle weiteren Präparationsschritte wurden strikt auf Eis und mit eiskaltem HBSS durchgeführt. Nach Entfernung der Nasenscheidewand (Septum) und des septalen Epithels wurde Riechepithel ausgewählter Regionen (s. Abb. 3.11 A, Ergebnisteil) von den knöchernen Turbinen mit feinen Pinzetten (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) gelöst und in HBSS auf Eis gelagert. Es wurde strikt darauf geachtet, dass das verwendete Riechepithel keine Knochen- bzw. Knorpelreste sowie stark beschädigtes Epithel mehr enthielt. Es wurden immer nur zwei Tiere für eine Einzelzell-Isolierung präpariert, um eine Präparationszeit von insgesamt 30-40 min nicht zu überschreiten.

#### Enzymatische Dissoziation

Vereinzelte olfaktorische Neuronen für die Herstellung von Einzelzell-cDNAs wurden durch enzymatischen Verdau des Riechepithels gewonnen. Das präparierte Riechepithel wurde hierfür mit einem Gewebehacker (Mc Illwain Tissue Chopper) zerkleinert ( $\sim 0,25 \text{ mm}^2$ ) und in HBSS überführt. Die enzymatische Gewebedissoziation erfolgte in HBSS mit 0,1 % Trypsin, 0,1 % Collagenase I und 0,05 % DNase I für 10-13 min bei 37°C. Nach Entfernung des Überstandes wurde mit 1 ml DMEM/10 % FBS (37°C) abgestoppt und das Gewebe mit einer feuerpolierten Pasteurpipette vorsichtig trituriert. Zur Abtrennung von größeren Zellaggregaten und Geweberesten wurde die Zellsuspension durch ein 70  $\mu\text{m}$ -Nylonnetz filtriert und das Filtrat pelletiert (250 x g, 2 min, RT). Nach Resuspension in frischem HBSS wurde nochmals filtriert (40  $\mu\text{m}$ -Nylonnetz) und im Anschluss zügig Zellzahl und Vitalität der Zellsuspension mittels Trypanblau-Ausschlußtest bestimmt. Tote, membrangeschädigte Zellen inkorporieren den Farbstoff Trypanblau und können so von vitalen, ungefärbten Zellen mikroskopisch unterschieden werden (Phillips und Terryberry, 1957). Hierfür wurde ein Aliquot Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt und in einer geeichten Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Als Berechnungsgrundlage dienten folgende Gleichungen:

$$\text{a) Zellzahl/ml} = \text{MW Zellzahl/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor}^{-1} \times 10^4$$

$$\text{b) Vitalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

### **Isolierung mittels Mikromanipulation**

Individuelle mOR37B-EGFP-positive (Typ I und M) sowie OMP-GFP-negative (Typ X) Riechsinneszellen wurden mit Hilfe eines für Mikromanipulation ausgerüsteten inversen Fluoreszenz-/Konfokalmikroskopes (TCS SP5, Leica Microsystems; 3D-Mikromanipulator, Brinkmann) isoliert. Die Einzelzellsuspension wurde hierfür auf silikonisierte Deckgläschen aufgetragen, um eine zu starke Adhäsion der Zellen an die Glasoberfläche zu vermeiden. Die Silikonbeschichtung erfolgte nach 30-minütigem Kochen der Deckgläschen in Ethanol (Reinigung) durch Benetzung mit Silikonlösung und wurde im Anschluss eingebrannt (120°C, 2 h). Zur Isolierung individueller Zellen wurden zudem feuerpolierte (Microforge MF-830, Narishige) Borosilikat-Glaskapillaren (Außen-Ø 1 mm, Wanddicke 0,13 mm; Hilgenberg GmbH, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von ca. 40 µm hergestellt (Einstellungen: Heater #1 = 11,03; Heater #2 = 7,80; Micropipette Puller PP-83, Narishige). Diese wurden über einen Kapillarenhalter mit einem manuellen Mikroinjektor (CellTram® vario, Eppendorf) verbunden und direkt vor Gebrauch mit Serum (FBS) beschichtet. Nach Eintauchen in einen Tropfen FBS wurde die Kapillarenspitze gefüllt, nach einigen Sekunden wieder entleert und danach mehrmals in einem jeweils frischen Tropfen HBSS gespült. Auf diese Art und Weise wurde gewährleistet, dass einzelne Zellen kontrolliert und ohne an der Kapillarwand anzuhaften (weder innen noch außen!) transferiert werden konnten. Jede einzelne Zelle wurde nach dem Einsaugen in die Kapillare zweimal in einen jeweils frischen Tropfen HBSS mit 1 % FBS überführt, die Kapillare darin mehrfach gespült und somit möglich, die RT-PCR störende Verunreinigungen aus der Zellsuspension entfernt. Jede Einzelzelle wurde in einem Volumen von  $\leq 0,5 \mu\text{l}$  HBSS/1% FBS in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 4 µl eiskaltem Lysepuffer (s. 2.3.2) transferiert, sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren und danach bis zu 4 Wochen bei -80°C gelagert. Die Zeit zwischen dem Tod des Tieres und dem Einfrieren der Einzelzelle betrug dabei maximal 3 h. Alle mit den Einzelzellen in Kontakt kommenden Lösungen und Geräte waren durch entsprechende Behandlung (s. 2.2) frei von RNase-Kontamination.

### **2.3.2 Herstellung von Einzelzell-cDNA-Tags**

Für die Synthese und Amplifikation von 3'-cDNA-Tags aus individuellen olfaktorischen Neuronen wurde ein optimiertes RT-PCR-Protokoll in Anlehnung an bereits beschriebene

Methoden (Dulac und Axel, 1995; Iscove et al., 2002) entwickelt. Ziel der Optimierung des im Folgenden beschriebenen Protokolls war es, eine repräsentationstreue und hoch sensitive Amplifikation von Einzelzell-Transkriptomen zu erreichen. Die wichtigsten Punkte dabei waren die Limitierung der reversen Transkription über Nukleotid-Konzentration und Reaktionszeit sowie die Erhöhung der Effizienz von Homopolymer-Tailing und PCR. Zur Vermeidung von Kontaminationen der Einzelzellproben mit Fremd-DNA wurden alle im Folgenden beschriebenen Reaktionen unter einer ausschließlich für Einzelzell-RT-PCR genutzten Sterilbank (Reinstraumbedingungen) angesetzt.

### **Reverse Transkription und RNaseH-Verdau**

Der bereits zum Aufnehmen und Einfrieren individueller olfaktorischer Neuronen verwendete Lysepuffer wurde für jede Einzelzell-Isolierung frisch hergestellt und setzte sich wie folgt zusammen: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 75 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,5 % (v/v) Igepal CA-630; 100 µg/ml acetyliertes BSA; je 10 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; 3,5 nM SR-T<sub>24</sub>-Primer (Tab. 1, Anhang II); 0,03 U/µl Prime RNase-Inhibitor™ (Eppendorf; inhibiert RNase A, RNase 1 und RNase T1); 0,03 U/µl Superscript™ RNase-Inhibitor (Ambion; inhibiert RNase A, RNase B und RNase C). Nach zügigem Auftauen der Proben erfolgte die Lyse der Zelle bei 65 °C für 90 s. Danach wurde auf 42°C abgekühlt und durch Zugabe von 100 U M-MuLV Reverse Transkriptase (RevertAid™ H Minus, Fermentas) die Erststrang-cDNA im 5 µl-Ansatz synthetisiert (15 min, 42°C). Nach Hitzeinaktivierung der Proben für 10 min bei 70°C wurde die mRNA im cDNA/RNA-Hybrid durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> zu einer Endkonzentration von 9 mM und 5 U RNase H (Amersham Biosciences) entfernt (15 min, 37°C) und somit die für die anschließende Tailing-Reaktion benötigte Einzelstrang-cDNA in einem Gesamt-Ansatzvolumen von nunmehr 8,1 µl erzeugt.

### **Poly(dA)-Tailing**

Eine Polyadenylierung (Homopolymer-Tailing) der Erststrang-cDNA am 3'-Ende war erforderlich, damit der bereits in der reversen Transkription verwendete SR-T<sub>24</sub>-Primer über seine poly(dT)-Sequenz an die durch Tailing eingefügte poly(dA)-Sequenz der Erststrang-cDNA binden und somit auch für Zweitstrangsynthese und PCR eingesetzt werden konnte. Nach Denaturierung der Proben (2 min 95°C, abschrecken auf Eis) erfolgte die Tailing-Reaktion im gleichen Ansatz durch Zugabe von Kalium-Phosphat-Puffer und dATP zu Endkonzentrationen von 10 mM (pH 7,0), bzw. 750 µM und 10 U Terminaler Transferase (Gesamt-Reaktionsvolumen nun: 13,9 µl) und Inkubation für 15 min bei 37°C. Im Anschluss wurde bei 65°C für 10 min hitzeinaktiviert und auf 4°C abgekühlt.

### Zweitstrangsynthese und PCR-Amplifikation

Der Reaktionsansatz wurde nach dem Tailing in drei separate Ansätze mit je 4,5 µl geteilt und mit PCR1-Mix (67 mM Tris-HCl, pH 8,8; 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01 % Tween 20; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10 µM SR-T<sub>24</sub>-Primer (Tab. 1, Anhang III); 2,5 U HotStart Taq-DNA-Polymerase (Genaxxon bioscience) und 0,05 U HotStart Pfu Turbo DNA-Polymerase (Stratagene) auf 25 µl gebracht. Zunächst wurde die Zweitstrang-cDNA synthetisiert (2 min 95°C, 2 min 52°C, 2 min 72°C) gefolgt von den ersten 35 Amplifikationszyklen (45 s bei 94°C, 1 min bei 60°C, 1 min bei 72°C). Die Gesamtkonzentration von MgCl<sub>2</sub> im Ansatz betrug dabei 4,2 mM. Im Anschluss wurden je 2 µl der 3 parallelen Ansätze vereinigt und 0,4 µl dieses cDNA-Pools mit 49,6 µl PCR2-Mix (2,5 µM SR-T24-Primer, ansonsten wie PCR1-Mix) nach Freisetzung der Polymerase (2 min 95°C) weiteren 30 PCR-Zyklen (45 s bei 94°C, 1 min bei 60°C, 2 min bei 72°C, final 10 min bei 72°C) unterzogen. Ausgehend von der mRNA einer einzelnen Zelle (~0,2 pg) liefert dieses Protokoll ca. 6 µg amplifizierte Einzelzell-cDNA, was einer 3x10<sup>7</sup>-fachen Amplifikation entspricht.

### 2.3.3 Klonierung der cDNA-Bibliothek

Um eine möglichst verlustfreie und repräsentationstreue Klonierung der komplexen mOR37B<sub>unreif</sub>-cDNA-Population (cDNA-Pool I) bei gleichzeitiger Minimierung negativer Klone zu realisieren, wurde ein neues Verfahren zur kontrollierten Klonierung von cDNA durch synchronen Restriktionsverdau und Ligation etabliert. Voraussetzung dafür waren die exakt ermittelten Konzentrationen an freien Enden von Sal I-geschnittenem Vektor und der fraktionierten, *Xho* I-geschnittenen I-Pool-cDNA.

### Gelfiltration und Restriktionsverdau der cDNA

Zur Eliminierung kürzerer DNA-Fragmente bzw. von Primerdimeren wurde der I-cDNA-Pool vor dem Klonieren durch Gelfiltration an Sephacryl S-400 HR-Säulen (Microspin S-400 HR, GE Healthcare) größenfraktioniert. Zunächst wurde das Gelbett durch Zentrifugation (1 min, 735 x g, RT) präpariert, die cDNA in einem Volumen von ca. 50 µl appliziert und zentrifugiert (2 min, 735x g, RT). Durch die Eigenschaft der verwendeten Gelfiltrationsmatrix, DNA-Fragmente < 270 bp abzureichern, wies die resultierende cDNA im Ausschluss-Volumen eine Größenverteilung von ~ 300-1500 bp auf.

Für die Ligation wurde die fraktionierte cDNA mit *Xho* I (NEB, 10 U/µg DNA) über Nacht bei 37°C verdaut und direkt im Anschluss durch Inkubation mit *CIP* (Calf Intestinal Phosphatase; 0,5 U/µg DNA) für 1 h bei 37°C dephosphoryliert. Nach Zugabe von 5 mM EDTA wurde inaktiviert (1 h, 65°C), der Reaktionsansatz aufgereinigt (DNA Clean & Concentrator™-25 Kit, Zymo Research) und der Dephosphorylierungsschritt wiederholt.

Die finale Aufreinigung erfolgte nach Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol über eine Säule (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel).

### **Vektorpräparation**

Für die Klonierung der Bibliothek wurde pBluescript I KS-Vektor für 3 h bei 37°C mit 10 U/µg *Sal I* (NEB, 30 x Überverdau) verdaut, sodass maximal noch 1 % unverdauter Vektor vorlag. Der Fortschritt des Verdaus wurde durch stündliche Probennahme und Analyse auf einem 0,7 %-igen Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, kontrolliert. Der linearisierte Vektor wurde nicht wie üblich dephosphoryliert, sondern direkt über eine Säule (DNA Clean & Concentrator™-25 Kit, Zymo Research) aufgereinigt und die Konzentration bestimmt (NanoDrop™ 1000, Peqlab).

### **Quantifizierung freier DNA-Enden**

Die Bestimmung der freien, ligationsfähigen Enden von Vektor und cDNA erfolgte über deren Markierung mit DIG-11-dUTP mittels Klenow Fragment (exo-) von DNA-Polymerase I und anschließende Dot Blot-Analyse. Auf diese Weise werden etwa 25% aller PCR-Abbruchstellen aber 100 % der *Xho I*-Enden markiert, in denen ein T das erste komplementäre Nukleotid ist. So sollte primär die Integrität der ligierbaren freien Enden der stark amplifizierten cDNA sichergestellt werden. Im Vorfeld der Markierungsreaktion wurde die exakte Konzentration von *Sal I*-geschnittenem Vektor und *Xho I*-geschnittener, CIP-dephosphorylierter und größenfraktionierter I-Pool-cDNA über eine Verdünnungsreihe (50, 25, 12, 6, 3 ng) im 0,7 %igen Agarosegel bestimmt. Densitometrisch ausgewertet (Image J) und quantifiziert wurde im Vergleich zu einem DNA-Standard (peqGOLD Range Mix, peqab) mit exakt definierten Mengen der einzelnen DNA-Fragmente. Anschließend wurden je 150 ng DNA in Gegenwart von 0,1 mM DIG-11-dUTP und 1 U Klenow Fragment (exo-, Fermentas) für 15 min bei 30°C markiert. Nach Inaktivierung (10 min, 75°C) wurde die markierte DNA verdünnt (s.o.) und in einem Gesamtvolumen von 100 µl TE mit einer Dot Blot-Apparatur auf einer Nylonmembran (positiv geladen, Roche Diagnostics) immobilisiert. Detektion und Quantifizierung des eingebauten Digoxigenins erfolgten analog des unter 2.2.4 für nicht-radioaktive Filterhybridisierung beschriebenen Protokolls.

### **3R-Ligation (*route and rate restricted ligation*)**

#### *Theoretische Vorbetrachtungen und enzymkinetisches Modell*

Im vorliegenden Fall handelt es sich bei der zu klonierenden cDNA-Population um eine vollständige Bibliothek von 3'-cDNA-*Tags* eines Einzelzell-Transkriptoms. Trotz ihrer hohen Sequenzdiversität ( $> 10^4$  verschiedene Sequenzen) sind die *Tags* auf Grund des Herstellungsverfahrens alle etwa gleich lang (ca. 0,5 kb) und homobifunktionell, also



gleich-endig (beidseitig *XhoI*-Schnittstelle aus dem SR-T<sub>24</sub>-Primer). Entsprechend muss der Klonierungsvektor mit kompatiblen, gleichnamigen Enden versehen sein. Bei homobifunktionellen, end-kompatiblen DNA-Fragmenten weist die Ligation ihre maximal mögliche Komplexität auf: Theoretisch können sich nämlich aus Vektor V und Insert I unendlich viele Produkttypen (linear  $V_nI_m$ , zirkulär  $V_nI_m$ , mit  $n,m = 0,1, \dots$ ) bilden. Erwünscht ist beim Anlegen einer Einzelzell-cDNA-Tag-Bibliothek zur differentiellen Hybridisierung jedoch nur ein einziger Typ, nämlich zirkulär VI (also  $n=m=1$ ), wobei I stellvertretend für die mehr als 10.000 verschiedenen cDNA-Tags steht. Diese unterscheiden sich zwar in ihrer informativen Sequenz, aber weder in den Enden, noch signifikant in ihrer Länge, so dass es *a priori* keinen Grund für unterschiedliche Ligationseffizienzen und damit verknüpfte Repräsentationsverschiebungen gibt. Eine mögliche Fehlerquelle stellen lediglich ligierbare, während der Erzeugung der cDNA-Tags durch PCR entstandene Primer-Dimere dar. Diese wurden jedoch vor der Ligation der Tags durch größenselektive Gelpermeations-Chromatographie weitgehend abgetrennt.

Bei der Ligation homobifunktionaler, endkompatibler DNA-Fragmente konkurrieren inter- (VI-Synthese; Erstligation) und intramolekulare Reaktionen (VI-Zirkularisierung; Zweitligation), die sich durch kinetische Kontrolle jedoch (annähernd) separieren und somit einzeln kontrollieren lassen. Für die Kinetik der intramolekularen Zyklisierung eines kettenförmigen Moleküls ist relevant, welche scheinbare Konzentration das Ende S des Moleküls in der Umgebung des Endes R desselben Moleküls erzeugt. Je kürzer die Kette, desto höher ist diese Konzentration (solange nicht sterische Effekte überwiegen). Die Gleichung für ihre Berechnung wurde von Jacobson und Stockmeyer (1950) entwickelt. Für ein I von 0,5 kb Länge ergibt sich daraus eine anscheinende Konzentration von 220 nM freier Enden, für ein DNA-Molekül von 3 kb (hier V) 12 nM und für ein 3,5 kb langes Molekül (hier VI) 9 nM. Spätere Veröffentlichungen zeigten, dass das JS-Modell bei kurzen Fragmenten eher zu hohe Konzentrationen liefert. Hier wurde deshalb mit einer korrigierten „JS“-Konzentration von 60 nM für I gerechnet (Shore et al., 1981). Um nun eine effiziente intermolekulare Reaktion zu erzielen, muss die Konzentration an freien Enden des größeren Reaktionspartners deutlich oberhalb der JS-Konzentration des kleineren Partners liegen, um intermolekulare gegenüber intramolekularen Interaktionen zu begünstigen. Bei der intermolekularen Ligation wurden V und zur Erreichung von Äquimolarität (s.u.) auch I deshalb im vorliegenden Fall bei Konzentrationen von je 140 nM an freien Enden (Legerski und Robberson, 1985) eingesetzt. Umgekehrte Anforderungen gelten, wenn eine intramolekulare Zyklisierung mit maximaler Selektivität erreicht werden soll. Deshalb wurde für die Zirkularisation von VI (Zweitligation) der Reaktionsansatz letztlich auf 1/100 verdünnt, um Konzentrationen unterhalb der JS-Konzentration von VI zu erzeugen. Neben den erwünschten VI-Produkten entstehen jedoch auch unerwünschte Produkte mit V-V-

und I-I-Bindungen, die durch Maßnahmen wie Restriktionsverdau oder Dephosphorylierung verhindert werden müssen. Grundsätzlich wären hierfür Reaktionsbedingungen, die nur für das Überleben von V-I-Bindungen permissiv sind und damit Produkte mit V-V- oder I-I-Bindungen ausschließen, durch den simultanen Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen im Ligationsansatz möglich. Sie müssten jeweils exklusiv an den Enden von I bzw. V schneiden, zueinander kompatible Enden hinterlassen und nach Ligation ein Produkt erzeugen, das von keinem der beiden Enzyme mehr angegriffen werden kann. Die Restriktionsenzyme *Xho* I (Schnittstelle CTCGAG, 5'-Überhang TCGA) und *Sal* I (Schnittstelle GTCGAC, 5'-Überhang TCGA) kommen dafür in Frage. Zudem treten ihre Erkennungssequenzen in cDNAs im Durchschnitt relativ selten auf, sodass die Gefahr reduziert wird, dass sie die *Tags* in signifikantem Ausmaß angreifen könnten (Hamilton und Shulman). Für die vollständige Eliminierung aller Leervektoren (V-V-Bindungen) nach der intramolekularen Ligation wurde hier deshalb tatsächlich *Sal* I verwendet. Die Konzentration des Restriktionsenzym ist dabei so hoch zu wählen, dass die sich im Fließgleichgewicht zwischen Ligation und Restriktion einstellende Konzentration an V-V-Bindungen nahe Null gehalten wird. Wegen der entsprechenden unit-Definitionen kompensiert ein unit Restriktionsenzym größenordnungsmäßig 1 celu (*cohesive end ligation unit*) Ligase. Wegen der *Multiple Cloning Site* in V ist es schwierig, ein Enzym zu finden, das nur in I, aber nicht in V schneidet und gleichzeitig mit dem V-exklusiven Enzym kompatible Enden erzeugt. Die Ausbildung von I-I-Bindungen wurde deshalb hier -anstatt durch simultane Anwesenheit des entsprechenden Restriktionsenzym bei der Ligation- durch vorherige Dephosphorylierung der *Xho* I-geschnittenen I-Enden unterdrückt. Dazu wurde *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) verwendet. Da für die 3R-Ligation größere Mengen an I benötigt werden, ist es wichtig zu beachten, dass CIP eine starke Produktinhibition durch anorganisches Phosphat aufweist ( $K_i=15\text{ }\mu\text{M}$ ). Die Konzentration bei der Phosphat-Abspaltung ist deshalb so niedrig zu wählen, dass eine nahezu vollständige Dephosphorylierung möglich ist.

Lineare Kondensationen führen grundsätzlich nicht zu einem einheitlichen Produkt, sondern zu einer Produktverteilung. Der Verlauf dieser Häufigkeitsverteilung hängt dabei vom Reaktionsfortschritt, d.h. dem (prozentualen) Anteil abreagierter freier Enden ab. Um den Anteil von Polymeren aus mehr als 2 Komponenten in der Produktmischung vernachlässigbar zu halten, wurde eine definierte Begrenzung des Reaktionsfortschrittes der intermolekularen Ligation notwendig. Gleichungen hierfür wurden von Flory (1936) entwickelt. Hieraus lässt sich ermitteln, dass bei einem Reaktionsfortschritt der intermolekularen Ligation von etwa 18% Dimere zu höheren, unter den hier vorliegenden Bedingungen zirkularisierbaren Multimeren (VIVI) in einem noch akzeptablen molaren

Verhältnis von 97:3 vorliegen. Die beiden Edukte sind bei diesem Reaktionsstand zu etwa 1/3 verbraucht.

Zur Abschätzung der für die beiden separaten Ligationsschritte erforderlichen Ligase-Mengen ist ein enzymkinetisches Modell erforderlich. Die tatsächliche Kinetik der T4-DNA-Ligase im Allgemeinen (Multisubstrat-Reaktion wegen MgATP, 5'-Phosphat-Ende, 3'-OH-Ende) und des hier besprochenen Reaktionssystems im Speziellen (simultane Restriktionsreaktion, Anwesenheit von dephosphorylierten Enden als kompetitive Inhibitoren) ist komplex und außerhalb des Rahmens dieser Arbeit. Für den vorliegenden Zweck genügt ein geeignet vereinfachtes Modell: Da MgATP zu Beginn der Reaktion sättigend ( $10 \times K_m$ ) vorliegt, kann es vernachlässigt werden. Als eigentliches Ligase-Substrat werden sodann nicht die freien Enden selbst, sondern basen-gepaarte freie Enden angesehen. Ihre Konzentration lässt sich aus der molaren Konzentration freier Enden mit Hilfe von Basenpaarungsgleichgewichten bei der jeweiligen Temperatur berechnen (Daten aus Mertz und Davis (1972)). Basen-gepaarte I-I-Enden sind dabei als kompetitive Inhibitoren anzusehen; sie besetzen wie die reaktiven Substrate selbst das aktive Zentrum, werden aber nicht umgesetzt. Nimmt man weiter an, dass die Restriktion von intermediär gebildeten V-V-Bindungen beliebig schnell verläuft, so kann auch die Wechselwirkung des Enzyms mit Basen-gepaarten V-V-Substraten als kompetitive Inhibition betrachtet werden, weil diese das aktive Zentrum besetzen, aber, obwohl sie unter ATP-Verbrauch umgesetzt werden, durch die sofortige Restriktion effektiv nicht depletiert werden. Mit diesen Annahmen kann die Reaktion zumindest zu Beginn als eine Michaelis-Menten-Einsubstrat-Enzymkinetik mit kompetitiver Hemmung behandelt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  wird in diesem Fall beschrieben durch die Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} S}{S + K_m (1 + \sum \frac{I}{K_i})}$$

Dabei ist  $v_{\max}$  die Maximalgeschwindigkeit der Umsetzung,  $S$  und  $I$  sind hier die Konzentrationen Basen-gepaarter Substrate und Inhibitoren und  $K_m$  und  $K_i$  Michaelis-Menten- bzw. Inhibitionskonstanten der Substrate und Inhibitoren. Zu Beginn der intermolekularen Ligation bilden nur intermolekulare V:I-Basenpaarungen Substrate, intra- und intermolekulare I:I- und V:V-Basenpaarungen dagegen Inhibitoren. Auch unter den V:I-Basenpaarungen ist effektiv nur diejenige Hälfte produktiv, bei denen das phosphorylierte 5'-Ende des Vektors mit dem 3'-OH-Ende des Inserts im aktiven Zentrum des Enzyms zu liegen kommt, die übrigen dagegen (dephosphoryliertes 5'-Ende des Inserts mit 3'-OH-Ende des Vektors) verhalten sich wie Inhibitoren. Zu Beginn der Zyklisierung von linear VI, sind nur intramolekulare V:I-Basenpaarungen produktiv (sogar effektiv wiederum nur die

Hälfte von ihnen), alle anderen Basenpaarungen erzeugen Inhibitoren (intermolekular V:I, inter- und intramolekulare I:I- und V:V-Basenpaarungen, sowie intermolekulare VI:I-, VI:V- und VI:VI-Wechselwirkungen). Für die Gleichgewichtskonstanten der Basenpaarung wurden aus den Daten von Mertz und Davis (1972) die Werte  $K/nM$   $1(11^{\circ}C)=0,02539$ ,  $K/nM$   $1(16^{\circ}C)=0,00707$  und  $K/nM$   $1(25^{\circ}C)=0,00079$  berechnet. Die verwendeten enzymkinetischen Parameter wurden auf Grund der Daten von Weiss et al., Raae et al. und Sugino et al. (Weiss et al., 1968; Raae et al., 1975; Sugino et al., 1977) ermittelt:  $K_m=600$  nM für ein basengepaartes Substrat mit freiem 5'-Phosphatende in Kochsalz-freiem Puffer,  $v_{max}/(nM/min*celu*\mu l)$   $1(11^{\circ}C)=17$ ,  $v_{max}/(nM/min*celu*\mu l)$   $1(16^{\circ}C)=23$  und  $v_{max}/(nM/min*celu*\mu l)$   $1(25^{\circ}C)=40$ . Es ist bekannt, dass T4-DNA-Ligase durch Kochsalz, das hier für die simultane Restriktion mit Sal I erforderlich war (100 mM), inhibiert wird (Raae et al., 1975). Aus eigenen Experimenten, in denen zwar Salz, jedoch kein Restriktionsenzym anwesend waren, wurde berechnet, dass die Umsetzung von Optimalsubstraten (phosphorylierte 5'-Enden in V:V-Basenpaarungen) in 100 mM Kochsalz etwa um den Faktor 1,86 reduziert ist. Suboptimale Substrate (5'-Enden bei fehlendem 5'-Phosphat im Gegenstrang, V:I-Basenpaarungen) werden darüber hinaus etwa 10-mal langsamer umgesetzt als Optimalsubstrate. Beide Effekte könnten daher rühren, dass die T4-DNA-Ligase den umzusetzenden Strangbruch an einer überschüssigen negativen Ladung erkennen könnte (Cherepanov und de Vries, 2002). Diese Erkennung wäre durch Gegenionen-Abschirmung in Salzlösungen oder durch Veränderung der Ladungsbilanz durch Abwesenheit einer Phosphatbrücke im Gegenstrang störfähig. Beide Geschwindigkeitsreduktionen wurden im Modell durch entsprechend erhöhte  $K_m$ - bzw.  $K_i$ -Werte berücksichtigt. Schließlich muss für die kinetische Betrachtung noch berücksichtigt werden, dass das Enzym im Reaktionsansatz mit einer Halbwertszeit von etwa 2h inaktiviert wird (Cherepanov und de Vries, 2001). Die Anfangskonzentration des Enzyms wurde daher immer so berechnet, dass die nach dem enzymkinetischen Modell erforderliche Konzentration im Zeitmittel der Reaktionsdauer vorlag. Mit diesen Überlegungen ergibt sich im vorliegenden Fall für die intermolekulare Synthese von linearVI ideal ein Enzymbedarf von etwa 12 celu/ $\mu l$  bei einer Reaktionsdauer von 2h bei  $25^{\circ}C$  (also 120 celu im 10  $\mu l$  Ansatz) und für die Zirkularisierung von VI etwa 13 bzw. 27 celu/ $\mu l$  bei einer Reaktionsdauer von 16 h bei 11 bzw.  $16^{\circ}C$  (also 13.000 bzw. 27.000 celu im verdünnten 1000  $\mu l$  Ansatz). Bei den Werten für die Zirkularisation ist zu berücksichtigen, dass sie mittels der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion berechnet wurden. Natürlich verlangsamt sich die Reaktion durch Verbrauch des Substrates (linearVI) fortwährend, sodass mit der angegebenen Enzymmenge und Reaktionszeit kein vollständiger Umsatz von linearVI in zirkulärVI zu erwarten ist. Es ist zu betonen, dass der

so berechnete Enzymbedarf um 1 bis 2 Größenordnungen über typischen Empfehlungen für konventionelle Ligationen liegt.

### *Experimentelle Details*

Die Etablierung des Grundprotokolls für die 3R-Ligation gemäß der obigen theoretischen Vorgaben erfolgte zunächst unter Verwendung eines 532 bp langen cDNA-Inserts aus der kodierenden Sequenz des Polypeptids A der RNA-Polymerase II (*polr2a*; Nukleotid 412-944) und des Vektors pBluescript I KS. Sie ist im Ergebnisteil (3.1.4) dargestellt.

Für die Klonierung von Einzelzell-cDNA-*Tags* wurde das Grundprotokoll mit einigen Modifikationen angewendet. Für die Erstligation wurden im 7 µl-Ansatz 945 ng Vektor und 254 ng cDNA (Konzentrations-Verhältnis an freien Enden von 1,25:1) in Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5 @ 25°C) mit 100 mM NaCl sowie 90 celu T4-DNA-Ligase (NEB) und 50 U *Sal* I (NEB) für 24 h bei 25°C inkubiert. Nach thermischer Inaktivierung (20 min, 65°C) wurde 1 µl zur späteren Analyse auf dem Agarosegel entnommen und der Reaktionsansatz 1:100 in Ligationspuffer verdünnt. Durch Zugabe von 6000 celu T4-DNA-Ligase (NEB) erfolgte die Zirkularisierung der während der Erstligation entstandenen V-I-Produkte bei 11°C über Nacht. Danach wurde erneut inaktiviert (40 min, 65°C) und der Ansatz über eine Säule aufgereinigt (DNA Clean & Concentrator™-5 Kit, Zymo Research). Die finale Linearisierung aller nicht inserttragenden, zirkulären V-V-Produkte erfolgte in *Sal*-I-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) unter Zusatz von 10 U/µg *Sal* I (Fermentas) bei 37°C über Nacht. Die Reaktion wurde abgestoppt (20 min, 65°C) und über eine Säule aufgereinigt (DNA Clean & Concentrator™-5 Kit, Zymo Research). Der Ligationserfolg wurde anhand eines charakteristischen Banden-Musters im Agarosegel sowie durch Nachweis der Ligationseffizienz nach Transformation mittels Colony-PCR (siehe 2.2.3) kontrolliert.

## **2.3.4 Herstellung und Screening der Kolonie-Filter**

### **Plattierung der Bibliothek auf Nylonmembran**

Die transformierte I-Pool-cDNA-Bibliothek wurde für das sich anschließende differenzielle Screening auf neutrale Nylon-Membranfilter (Hybond NX, 132 mm Ø, GE Healthcare) plattiert, wobei eine optimale Kolonienverteilung über das Durchsaugen der Bakteriensuspension durch eine Glas-Fritte (Porosität 3, Schott) erreicht wurde.

Hierfür wurden ein 3MM-Papier und ein Nylonfilter mit LB-Medium befeuchtet und nacheinander auf eine LB-durchnässte Glas-Fritte auf einer Absaugapparatur mit Wasserstrahlvakuum (Eigenbau) blasenfrei aufgelegt. Überschüssiges Medium wurde durch kurzes Anlegen von Vakuum entfernt. Von der mit LB<sup>Amp</sup>-Medium auf eine Dichte von

~ 500 cfu/ml eingestellten Bakteriensuspension wurden 9 ml gleichmäßig über den Nylonfilter ausgebreitet und durch Anlegen von Vakuum langsam aufgesaugt. Unter Beibehalten des Vakuums wurde der Filter vorsichtig abgehoben, auf eine frische LB<sup>Amp</sup>-Platte (145 mm Ø) transferiert und bis zum Erreichen eines Kolonie-Durchmessers von ca. 1 mm bei 37°C inkubiert. Insgesamt 6 „High-density“-Filter mit je ~4500 Kolonien wurden auf diese Weise hergestellt, sodass eine 27.000 Klone umfassende cDNA-Bibliothek vorlag. Diese sog. Master- oder Primärfilter wurden über Nacht bei 4°C gelagert.

### **Herstellung der Replika-Filter**

Vorbereitend wurden 2 Blatt 3MM-Papier in LB-Medium getränkt und überschüssige Flüssigkeit zwischen zwei trockenen Papierlagen entfernt. Auf einer frischen LB<sup>Amp</sup>-Platte wurde zudem ein weiterer Membranfilter als Replika-Filter angefeuchtet. Auf planem Untergrund wurde zunächst der Master-Filter „colony-side-up“ auf ein befeuchtetes 3MM-Papier gelegt, darauf der Replika-Filter und schließlich das zweite befeuchtete 3MM-Papier. Für eine optimale Übertragung der Kolonien wurde mit einer Glasplatte ausgiebig festgedrückt. Die Platte sowie das obere 3MM-Papier wurden vorsichtig abgenommen und beide Filter mit einer Kanüle eindeutig markiert. Anschließend wurden Primärfilter und Replikat langsam voneinander getrennt, mit der Kolonieseite nach oben auf LB<sup>Amp</sup>-Platten zurückgelegt und bei 37°C nachinkubiert bis alle Kolonien wieder deutlich sichtbar waren.

### **Aufbewahrung des Master-Filters**

Die Lagerung der Primärfilter erfolgte als Glycerin-Dauerkulturen tiefgefroren bei -80°C (Kryokonservierung). Ein 3MM-Papier wurde hierfür in LB mit 25 % Glycerin getränkt und der Primärfilter mit der Kolonieseite nach oben aufgelegt. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurde eine Folie mit aufgedrucktem mm-Raster auf die Kolonieseite des Primärfilters aufgelegt und vorsichtig angedrückt. Die Markierungen des Primärfilters wurden neben dieser noch auf eine zweite mm-Rasterfolie übertragen, die später der Orientierung korrespondierender Phosphor-Images diente. Der Stapel aus 3MM-Papier, Primärfilter und Rasterfolie wurde zwischen zwei Folien bei -80°C gelagert.

### **Prozessierung der Replika-Filter (Sambrook-Methode)**

Für die nachfolgende Hybridisierung musste die DNA aus den Bakterien freigesetzt, denaturiert und nach Neutralisierung an die Membran fixiert werden. Dies geschah durch sequentielle Inkubation der Filter mit der Kolonieseite nach oben auf getränktem 3MM-Papier wie folgt: 4 min Lyse in 10 % SDS, 5 min Denaturierung in 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl, 2 x 5 min Neutralisierung in 0,5 M Tris, pH 7,6 / 1,5 M NaCl, 3 min flottieren und danach 5 min komplett spülen in 2x SSC/2 mM EDTA. Die Fixierung der DNA auf den

luftgetrockneten Filtern erfolgte durch 1-minütige UV-Bestrahlung (Transilluminator TI 2, Biometra). Die Replika-Filter wurden trocken zwischen 3MM-Papier und in Aluminiumfolie verpackt bei RT gelagert. Kurz vor der Hybridisierung wurden die Membranfilter zur Entfernung von Bakterienrückständen 5 min in 2x SSC gespült und danach für 30 min in 50°C warmem 6x SSC schüttelnd inkubiert. Der Zelldebris wurde anschließend in 6x SSC mit Kimwipes vorsichtig abgewischt und die Filter bis zur Hybridisierung in „Happy membrane“-Lösung (2x SSC, 0,2 % SDS, 10 mM EDTA) bei 4°C aufbewahrt.

### **Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden**

Für das differenzielle Screening der Einzelzell-cDNA-Bibliothek wurden radioaktiv markierte cDNA-Sonden benötigt, die aus den zelltypspezifischen cDNAs mittels PCR hergestellt wurden. Je 1 µg cDNA wurde im 100 µl-Ansatz in Gegenwart von 250 µCi  $^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mmol, GE Healthcare), je 200 µM dNTP<sup>A</sup>, 10 µM dATP und 2,5 µM SR-T<sub>24</sub>-Primer mittels PCR (2 min 95°C, 10 Zyklen: 1 min 94°C, 2 min 57 °C und 10 min 72°C) radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA beendet und nicht-inkorporierte Nukleotide über eine Säule (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel) abgetrennt. Zur Überprüfung der Qualität der radioaktiven Markierung wurde die spezifische Aktivität der Sonde durch Messung von Cerenkov-Strahlung im Szintillationszähler (Tri-Carb, Perkin Elmer) bestimmt (1 µl markierte cDNA in 2 ml Scintillationsflüssigkeit). Sie lag im Durchschnitt bei  $6 \times 10^7$  cpm/µg cDNA, jedoch mindestens bei  $4 \times 10^7$  cpm/µg cDNA.

### **Radioaktive Filterhybridisierung**

Zur Minimierung von Hintergrundsignal durch unspezifisches Binden der  $^{32}\text{P}$ -markierten cDNA-Sonden während der Hybridisierung wurden die Colony-Filter mit Lachsspermien-DNA (100 µg/ml) und poly(A) (1 µg/ml) blockiert. Nach Denaturierung (5 min 100°C, abschrecken auf Eis) wurde die DNA der auf 42°C temperierten Hybridisierungslösung zugesetzt und die Filter 2 h bei 42°C prähybridisiert. Direkt im Anschluss wurde mit  $^{32}\text{P}$ -markierten, zelltypspezifischen cDNA-Sonden aus dem mOR37B<sub>unreif</sub> (I)-, mOR37B<sub>reif</sub> (M)- bzw. mORX<sub>unreif</sub> (X)-cDNA-Pool in Hybridisierungslösung bei 42°C über Nacht hybridisiert. Die Sonden wurden dabei in einer Konzentration von  $1,2\text{--}1,5 \times 10^7$  cpm/ml eingesetzt und ebenso wie die Blockierungs-DNA zuvor denaturiert. Die Schmelzpunktbestimmung der DNA/  $^{32}\text{P}$ -cDNA-Hybride erfolgte nach der in Tabelle 3 (s. Anhang III) angegebenen Formel ausgehend von einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 35 % und einer minimalen cDNA-Länge von 100 bp.

Ungebundene Sonde wurde nach der Hybridisierung durch stringentes Waschen mit je 50 ml Hybridisierungslösung für 2x15 min und 0,1x SSC/ 0,1 % SDS für 3x10 min bei 42°C

entfernt. Die letzte Waschlösung wies keine mit dem Handmonitor nachweisbare Aktivität mehr auf. Nach Kennzeichnung der Stanz-Markierungen mittels radioaktiver adhäsiver Dots wurden die noch feuchten Filter in Folie verpackt und eine Imaging-Platte (Fujifilm Europe) für 1 h exponiert und anschließend ausgelesen (Phosphor-Imager FLA-3000, Fujifilm Europe GmbH).

Jeder Filter wurde zuerst mit der M-, danach mit der X- und zuletzt mit der I-cDNA-Sonde hybridisiert. Gebundene Sonde wurde vor jeder weiteren Hybridisierung durch Strippen der Membranfilter mit 0,2 M NaOH/0,1% SDS für 10 min bei 42°C entfernt. Das Strippen wurde bis zu zweimal wiederholt, bis keine Aktivität mehr auf den Filtern mit dem Handmonitor messbar war. Danach wurde in 2x SSC für 15 min gewaschen und die Filter in „Happy membrane“-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

### **Manuelle und computergestützte Auswertung des differenziellen Screenings**

Von jedem der sechs I-Pool-cDNA-Filter lagen nach radioaktiver Hybridisierung drei digitale Aufnahmen entsprechend der verwendeten M-, X- und I- cDNA-Sonden vor. Anhand der Filtermarkierungen wurden die korrespondierenden Bilder mit der Bildbearbeitungs- Software Adobe® Photoshop (Version 6.0.1; Adobe Systems Inc., San Jose, CA) deckungsgleich übereinander gebracht, invertiert und nach Zuweisen von RGB-Farbkanälen ausgewertet. Zuvor wurde die Gesamt-Signalintensität der korrespondierenden Filter mit der *multiply*-Funktion der ImageJ- Software (Version 1.33u, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) angeglichen, um zufällige Intensitätsfluktuationen zu minimieren. Kolonien, die durch Hybridisierung mit zwei bzw. drei Sonden nach Überlagerung Mischfarben aufwiesen, wurden als nicht differenziell exprimiert betrachtet, eindeutig grüne (I-cDNA) dagegen als differenziell. Die Positionen aller eindeutig grünen, also mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen Klone wurden schließlich zusammen mit den Filtermarkierungen auf Auswertungsmasken übertragen, die für die Identifizierung der zu isolierenden Kolonien eingesetzt wurden. Zur Absicherung wurde zusätzlich eine manuelle Auswertung der auf Folien ausgedruckten S/W-Bilder durchgeführt.

### **Kolonien "picken"**

Auswertungsmasken mit den Positionen der identifizierten mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen Klone sowie den Filtermarkierungen dienten dem Auffinden der entsprechenden Kolonien auf den Master-Filtern. Ein Primärfilter wurde auf eine Metallplatte auf Trockeneis gelegt, die Auswertungsmaske an seinen Markierungen ausgerichtet und die Kolonien durch Ausschneiden eines 2x2 mm-großen Filterstückes mit einem sterilen Skalpell isoliert. Jedes Filterstück wurde in 100 µl eiskaltes LB-Medium mit 15 % Glycerin in 96well-Platten überführt und für die Zeit der Isolierung auf Eis gelagert. Von allen „gepickten“ Kolonien



eines Filters wurde schließlich aus je 20 µl ein Pool gebildet, woraus ein entsprechendes Volumen einer 1:1000-Verdünnung für das Bestätigungsscreening plattiert wurde. Im Anschluss wurden die Pools als Glycerin-Stocks bei -80°C gelagert.

### **Bestätigungsscreening**

Die identifizierten und isolierten Klone des Hauptscreens wurden zur Bestätigung ein zweites Mal bei deutlich geringerer Koloniedichte nachgescreent. Vorversuche zeigten, dass pro isoliertem 2x2 mm-Filterstück neben der gewünschten noch zwei weitere Kolonien mit isoliert wurden. Um jeden der drei Klone statistisch gesehen mindestens dreimal pro Platte vorliegen zu haben, wurde die 10-fache Menge der im Hauptscreen pro Filter isolierten Kolonien erneut ausplattiert. Aufgrund der geringeren Koloniedichte im Bestätigungsscreening konnten zwei Filter des Hauptscreens gepoolt werden, sodass letztendlich 5 Filter mit durchschnittlich je 700 Kolonien nachgescreent wurden. Im Unterschied zum Hauptscreen wurde die Bakteriensuspension jedes Filter-Pools hier direkt auf LB<sup>Amp</sup>-Platten (145 mm Durchmesser) ausplattiert, die dann als Master für das Replika-Plating dienten. Alle weiteren Schritte (Prozessierung der Replika-Filter, radioaktive Filterhybridisierung, Auswertung) erfolgten analog der beschriebenen Methoden. Bestätigte mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifische Klone wurden zur Sicherung auf LB<sup>Amp</sup>-Platten ausgestrichen und für die Sequenzierung in 96well-Agarplatten angeimpft.

### **Sequenzierung und Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung von insgesamt 192 bestätigten differenziellen Klonen, einschließlich Anzucht und Plasmidisolierung, wurde bei der GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) in Auftrag gegeben. Es wurde im 96well-Maßstab mittels ABI-Technologie (ABI 3730 XL) unter Verwendung des T3-Primers (Tab. 1, Anhang III) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung des megaBLAST-Programms (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit den in der NCBI-Gendatenbank annotierten Sequenzen des Mausgenoms verglichen und analysiert.

## **2.4 Histologische Methoden**

### **2.4.1 OMP-Immunfärbung**

Zur Feineinstellung der Dissoziationsparameter im Hinblick auf eine neuronenschonende Vereinzelung der Riechsinneszellen (siehe 2.3.1) wurde der Anteil von OSNs in der Einzelzellsuspension nach Immunmarkierung mit Antikörpern gegen OMP (*olfactory marker protein*), einem Marker für reife olfaktorische Neuronen, ermittelt.

### **Concanavalin-A-Beschichtung**

Zur verbesserten Haftung der Zellen an der Objektträgeroberfläche wurde diese mit dem Lektin Concanavalin A beschichtet. Zwei Felder pro OT wurden mit einem PapPen umrandet und mit je 0,2 ml Concanavalin-A-Lösung (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) beschichtet. Nach Inkubation in einer feuchten Kammer (PBS) für 30 min bei RT wurden die OTs für die Zeit der Gewebepreparation und -dissoziation bei 4°C gelagert.

### **Immunfärbung**

Nach erfolgter Gewebedissoziation wurde die Concanavalin-A-Lösung von den Objektträgern abgesaugt und mit PBS nachgespült. Sofort wurden 100 µl Zellsuspension/Feld aufgetragen und zum Absetzen der Zellen für 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen von überschüssigem PBS wurden die Zellen in 4 % PFA (30 min, RT) fixiert. Im Anschluss wurde 3x 5 min in PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen und in 10 % Pferdeserum/ 2 % Blocking Reagenz in MaBS (30 min, RT) blockiert. Danach erfolgte die Bindung des Primärantikörpers (Ziege-anti-OMP 255, polyklonal; 1:10000 in Serum/BR) für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach dem Waschen in PBS mit 0,1 % Triton X-100 (3x 5 min, RT) folgte eine 30-minütige Inkubation mit Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörpern (Esel-anti-Ziege Cy3-IgG, 1:200 in Serum/BR) bei RT in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss. Überschüssige Antikörper wurden danach durch Waschen (3x 5 min, PBS/ 0,1 % Triton X-100) entfernt und gleichzeitig die Zellkerne durch Zugabe von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, 1:1000 in Waschpuffer) während der ersten beiden Waschschriffe angefärbt. Die Präparate wurden abschließend in Mowiol mit n-Propylgallat eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch (inverses Axiovert S 100-Mikroskop, ZEISS; mit Spot-Farbkamera und dazugehöriger Software) ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden Gesamtzellzahl und Anzahl OMP-positiver Zellen für je 3 gleich große Regionen pro Bedingung ermittelt.

### **2.4.2 *In-situ*-Hybridisierung**

Zur Validierung wurden die durch differenzielles Screening einer mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen cDNA-Bibliothek identifizierten Transkripte hinsichtlich ihrer Expression im sich entwickelnden olfaktorischen System mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH) analysiert. Der Einsatz von digoxigeninmarkierten antisense-RNA-Sonden, die nach Bindung an ihre komplementäre Target-mRNA im Gewebe sehr stabile RNA:DIG-RNA-Hybride ausbilden, erlaubte eine Hybridisierung unter stringenten Bedingungen. Alle Schritte bis einschließlich der Hybridisierung wurden unter strikt RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

### **Silanisierung von Deckgläsern**

Aufgrund der Eigenschaft von Nukleinsäuren, gut an Silikate zu binden, war eine Silanisierung der für die Hybridisierung benötigten Deckgläser notwendig. Diese „Antihaft“-Beschichtung verhinderte ein unspezifisches Binden von RNA-Sonden an die Glasoberfläche. RNase-freie Deckgläser wurden hierfür kurz in Repel-Silan ES (2 % Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan, PHARMACIA) getaucht, danach in Aceton und abschließend in absolutem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.

### **Aufarbeitung des Gewebes**

Embryonen (E16) wurden dem Muttertier nach Tötung mit CO<sub>2</sub> durch Kaiserschnitt entnommen und ebenso wie postnatale Tiere (P7) rasch dekapitiert. Der komplette Kopf wurde sofort in Isopentan auf Trockeneis bei -40°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nach Auffrieren des Kopfes auf einen Objekttisch mit Tissue-Tek (SAKURA) wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM 3050) 16 µm dicke konsekutive, koronale Schnittserien der Nase, beginnend mit dem Vomeronasalorgan bis einschließlich der Bulbi olfactorii, angefertigt und auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel Gläser) aufgenommen. Nach Trocknung für ≤ 3 h bei 56°C wurden die Objektträger bis zur Hybridisierung bei -80°C aufbewahrt.

### **Vorbehandlung der Schnitte und Hybridisierung**

Die Objektträger mit den noch unfixierten Gewebeschnitten wurden zur Minimierung von RNase-Aktivität zunächst auf einer Heizplatte bei 56°C aufgetaut und circa 1 h getrocknet. Nach leichter Fixierung in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 15 min bei RT wurde das Gewebe in 0,2 M HCl permeabilisiert (15 min, RT). Anschließend wurden positive Ladungen durch Acetylierung mit 5 mM Acetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin/HCl (pH 8,0) neutralisiert, um ein unspezifisches Anheften der RNA-Sonden zu verhindern. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit PBS gespült. Für die nachfolgende Hybridisierung wurden 3 ng/µl RNA-Sonde in Hybridisierungslösung (5x SSC, 50 % Formamid, 0,4 mg/ml Torula-RNA<sup>5</sup>, 0,1 mg/ml tRNA) denaturiert (3 min 100°C, abschrecken auf Eis) und nach Zugabe von Denhardt's Reagenz (ad 5x) in einem Volumen von 145 µl auf die Objektträger aufgetragen. Danach wurde ein silanisiertes Deckglas blasenfrei aufgelegt und über Nacht (16 h) bei Hybridisierungstemperatur in einer feuchten Kammer (5x SSC, 50 % Formamid auf 3MM-Papier) inkubiert. Die Berechnung der Schmelzpunkte (T<sub>m</sub>) von RNA:DIG-RNA-Hybriden (ISH) erfolgte nach der in Tabelle 3 (s. Anhang III) angegebenen Gleichung, die durch Erweiterung um den Term -25°C die

---

<sup>5</sup> Torula-Hefe RNA wurde durch Proteolyse von RNase-Kontamination befreit (25 mg/ml Torula-Hefe RNA Typ VI in 10 mM Tris/HCl pH=7,5; 5mM EDTA, 0,5% SDS in Gegenwart von 50 µg/ml Proteinase K, 55°C, über Nacht), 2x mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und in TE pH 7,5 aufgenommen.

Digoxigenin-Markierung und schlechtere Zugänglichkeit des Targets für die Sonde im Gewebe berücksichtigt (Weth, 1993).

### **Detektion der Hybride**

Nach der Hybridisierung wurden Deckgläschen und ungebundene Sonde in 5x SSC bei RT abgespült, unspezifisch gebundene Sonde wurde in mehreren Waschschritten bei hoher Stringenz entfernt. Es wurde 30 min in 50% Formamid/ 2x SSC und anschließend 60 min in 0,2x SSC jeweils bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, gefolgt von einem 15-minütigen Waschschriff in 0,2x SSC bei RT. Nach kurzem Umpuffern in 1x MaBS (5 min, RT) wurde 1 h in Blockierungslösung (hier: 2 % Blocking-Reagenz in MaBS) blockiert. Zum immunhistochemischen Nachweis der gebundenen DIG-markierten Sonden wurden die Objektträger mit je 145 µl AP-konjugierten anti-DIG-Fab-Antikörperfragmenten (1:750 in 2 % Blocking-Reagenz in MaBS) in einer feuchten Kammer inkubiert (30 min, RT). Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in MaBS (3x 10 min, RT) entfernt. Nach kurzer Äquilibrierung in Reaktionspuffer (pH 9,5), dem zur Inhibierung endogener alkalischer Phosphatasen eine Spatelspitze Tetramisol zugesetzt war, erfolgte die Farbreaktion zur Detektion der Hybride mit 0,4 mM Nitroblautetrazoliniumchlorid (NBT) und 0,4 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 4-Toluidinsalz (BCIP) in Reaktionspuffer. Inkubiert wurde in einer feuchten Kammer (im Dunkeln!) bei RT für bis zu 48 h. Nach Erreichen eines optimalen Färbeergebnisses wurden die Präparate in PBS gespült, in Mowiol eingebettet und mittels Differenz-Interferenzkontrast-Mikroskopie (Axiovert S 100-Mikroskop, invers, ZEISS; in Kombination mit einer Spot-Farbkamera und dazugehöriger Software) dokumentiert.

### **2.4.3 *In-situ*-Hybridisierung mit kombinierter GFP-Immunfluoreszenz**

Der Nachweis der ncRNA in mOR37B-GFP-positiven Neuronen *in situ* erfolgte durch die Kombination von *in-situ*-Hybridisierung mit einer DIG-markierten ncRNA-antisense-Sonde und Immunfluoreszenz mittels anti-GFP/Alexa488. Das im Folgenden beschriebene Protokoll weicht dabei deutlich von dem für Standard-*in-situ*-Hybridisierung (siehe 2.4.2) ab.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst 30 min bei 37°C aufgetaut und getrocknet. Fixierung, Permeabilisierung sowie Acetylierung erfolgten wie bereits unter 2.4.2 beschrieben. Als essentiell für eine erfolgreiche anti-GFP Immunfärbung erwies sich eine zusätzliche Denaturierung und Permeabilisierung durch Dehydrieren des Gewebes in einer ansteigenden Ethanolreihe (je 2 min 70%, 80% und 96% Ethanol, unvergällt). Die luftgetrockneten Schnitte wurden anschließend mit 145 µl Hybridisierungslösung mit 3 ng/µl RNA-Sonde benetzt. Die Nukleinsäuren wurden zuvor separat denaturiert (3 min 99°C,

Eis). Nach dem Aufbringen silanisierter Deckgläser wurden die Objektträger bei 64°C über Nacht in einer feuchten Kammer hybridisiert.

Ungebundene sowie unspezifisch gebundene Sonde wurde in mehreren Waschschritten analog zum Standard-Protokoll (5 min 1x SSC bei RT, 2x 15 min 0,2x SSC bei RT, 2x 30 min 0,1x SSC bei 50°C, 5 min 2x SSC bei RT) entfernt. Nach kurzer Äquilibrierung in TBS (pH 7,5) wurden die Schnitte zunächst in 0,5 % Blocking-Reagenz (in TBS, pH 7,5) für 1 h blockiert und anschließend mit AP-konjugierten anti-DIG Fab-Fragmenten (1:500, Roche Diagnostics) sowie anti-GFP Antikörpern (1:300, Acris) in 0,5 % Blocking-Reagenz in TBS für 2 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte in TBS/ 0,05 % Tween 20 folgte eine 60-minütige Inkubation mit Alexa Fluor® 488-konjugierten Sekundär-Antikörpern (1:300, Molecular Probes) in 0,5 % Blocking-Reagenz in TBS bei RT. Anschließend wurde in TBS/ 0,05 % Tween 20 gewaschen (5x 5 min), wobei dem 4. Waschschr. zur Gegenfärbung der Zellkerne DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, 0,1 µg/ml in TBS pH 7,5) zugesetzt wurde. Direkt im Anschluss wurden die GFP- und DAPI-Signale in allen Schnitten mittels Digitalfotografie (Fluoreszenz-Mikroskop BX40 ausgestattet mit Digitalkamera DP70, beides Olympus, Hamburg) dokumentiert. Sofort danach erfolgte nach Umpufferung in Reaktionspuffer (pH 9,5)/Tetramisol die Detektion der ISH-Signale mit NBT/BCIP analog dem Standard-ISH-Protokoll (2.4.2). Zur Auswertung wurden GFP-, DAPI- u. ISH-Signal Falschfarben-kodiert (RGB) und überlagert (Adobe Photoshop 6.0.1).

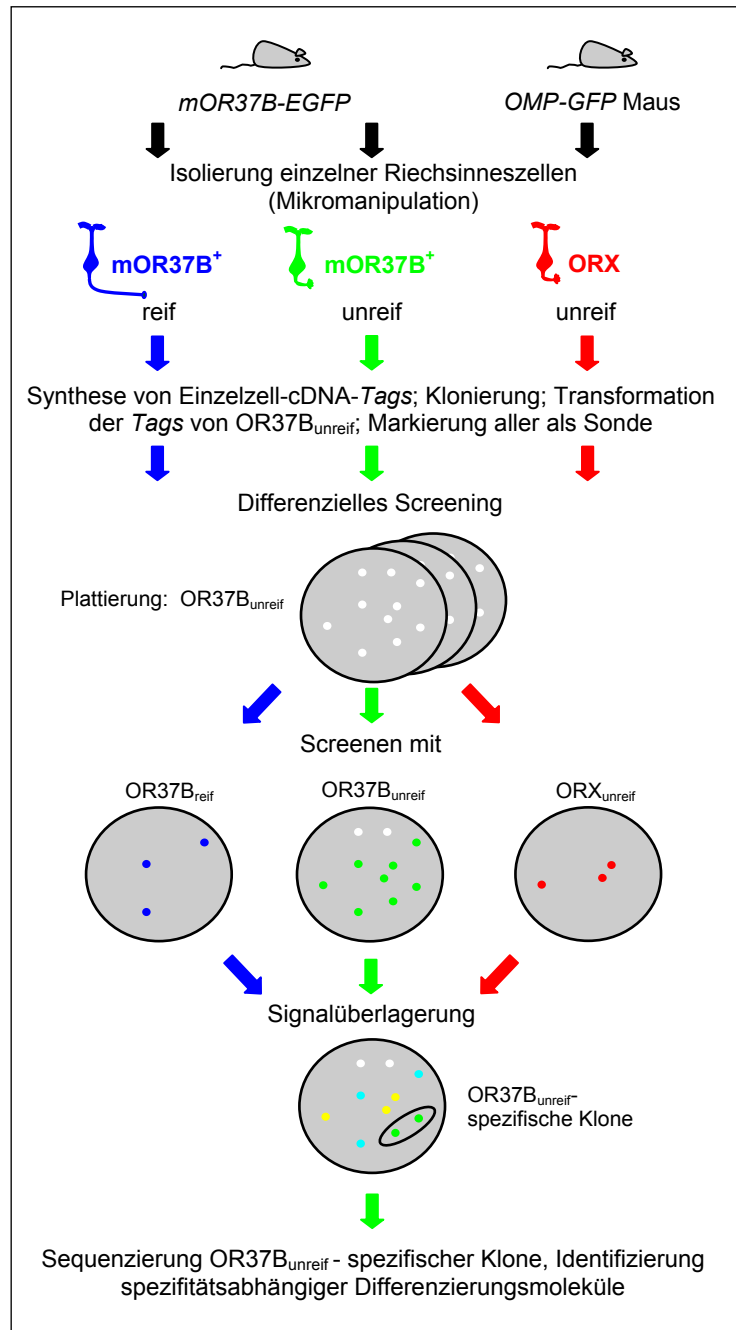
#### **2.4.4 Nissl-Färbung**

Zur besseren anatomischen Beurteilung der ISH-Ergebnisse wurde eine histologische Übersichtsfärbung nach Nissl an konsekutiven Kryostatschnitten des Riechepithels (s. 2.4.2) angefertigt. Der verwendete Farbstoff Kresylviolett bindet an raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und färbt somit die rER-reichen Somata von Neuronen stark blau-violett, im Gegensatz zu den Zellfortsätzen (Axone + Dendriten), die nicht angefärbt werden.

Nach dem Auftauen wurden die Gewebeschnitte für  $\leq 30$  min bei 37°C (Heizplatte) getrocknet und im Anschluss in 5 % Eisessig/ Ethanol (reinst, 95 %) für 30 min fixiert. Nach kurzem Spülen in Aqua bidest. erfolgte die Inkubation in Kresylviolett-Lösung (0,5 % in Acetatpuffer) je nach Alter der Lösung für 5-15 min. Das Gewebe wurde hierbei stark überfärbt und in der darauf folgenden aufsteigenden Alkoholreihe unter Sichtkontrolle wieder entfärbt. Nach kurzem Waschen in Aqua bidest. wurde die Färbung in 50 %- und 70 %-igem Ethanol differenziert und die Schnitte danach für je 2 min in 95 % und 2x 100 % Ethanol dehydriert. Nach Überführen in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan® (Merck) eingedeckt.

### 3. ERGEBNISSE

Eine doppelt-differenzielle cDNA-Screening-Strategie auf Einzelzell-Ebene wurde verfolgt, um geruchsrezeptor-phänotyp-spezifische Differenzierungsgene sich „verdrahtender“ olfaktorischer sensorischer Neuronen (OSNs) zu finden. Zu diesem Zweck wurde eine transkriptomtreue 3'-cDNA-Tag<sup>6</sup>-Bibliothek einzelner unreifer olfaktorischer Neuronen der exemplarischen Rezeptorspezifität mOR37B hergestellt und anschließend mit drei verschiedenen Sondenpopulationen differenziell hybridisiert: A) mit einer Einzelzell-Sondenpopulation desselben unreifen Neuronentyps (mOR37B<sub>unreif</sub>) als Positivkontrolle. Außerdem zur Auffindung differenzieller Klone B) mit einer Einzelzell-Sondenpopulation reifer Neuronen derselben Rezeptorspezifität (mOR37B<sub>reif</sub>) und C) mit einer Einzelzell-Sondenpopulation unreifer OSNs beliebig anderer Spezifität (ORX<sub>unreif</sub>) (Abb. 3.1). Folglich sollten Klone, die der Logik "A NICHT (B ODER C)" folgen, spezifisch für sich gerade verdrahtende OSNs der untersuchten Rezeptorspezifität mOR37B sein und somit höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit ihrer geruchsrezeptor-phänotyp-spezifischen Differenzierung (z.B. ihrem spezifischen axonalen Lenkungsapparat)



**Abb. 3.1:** Doppelt-differenzielles Screening einer Einzelzell-cDNA-Tag-Bibliothek zur Suche nach spezifitätsassoziierten Differenzierungsmolekülen im sich entwickelnden Geruchssystem.

<sup>6</sup> Tag: kurzes bzw. verkürztes Stück einer transkribierten Nukleotidsequenz

stehen. Jeder einzelne Schritt dieser artefakt-anfälligen, anspruchsvollen Methode bedarf individueller Entwicklung bzw. Optimierung. Ein Einzelzell-Transkriptom enthält etwa 200-500 fg mRNA, vermutlich bestehend aus ca. 20.000 verschiedenen zu analysierenden molekularen Spezies. So soll sicher gestellt sein, dass die Einzelzell-Transkriptome hocheffizient amplifiziert werden, die Amplifikation nicht zu Verzerrungen der Transkript-Repräsentation führt, dass die Amplifikationsprodukte erschöpfend und frei von Artefakten kloniert werden können und dass eine hochsensitive Detektion bei der differentiellen Hybridisierung gewährleistet ist.

### **3.1 Methodische Resultate**

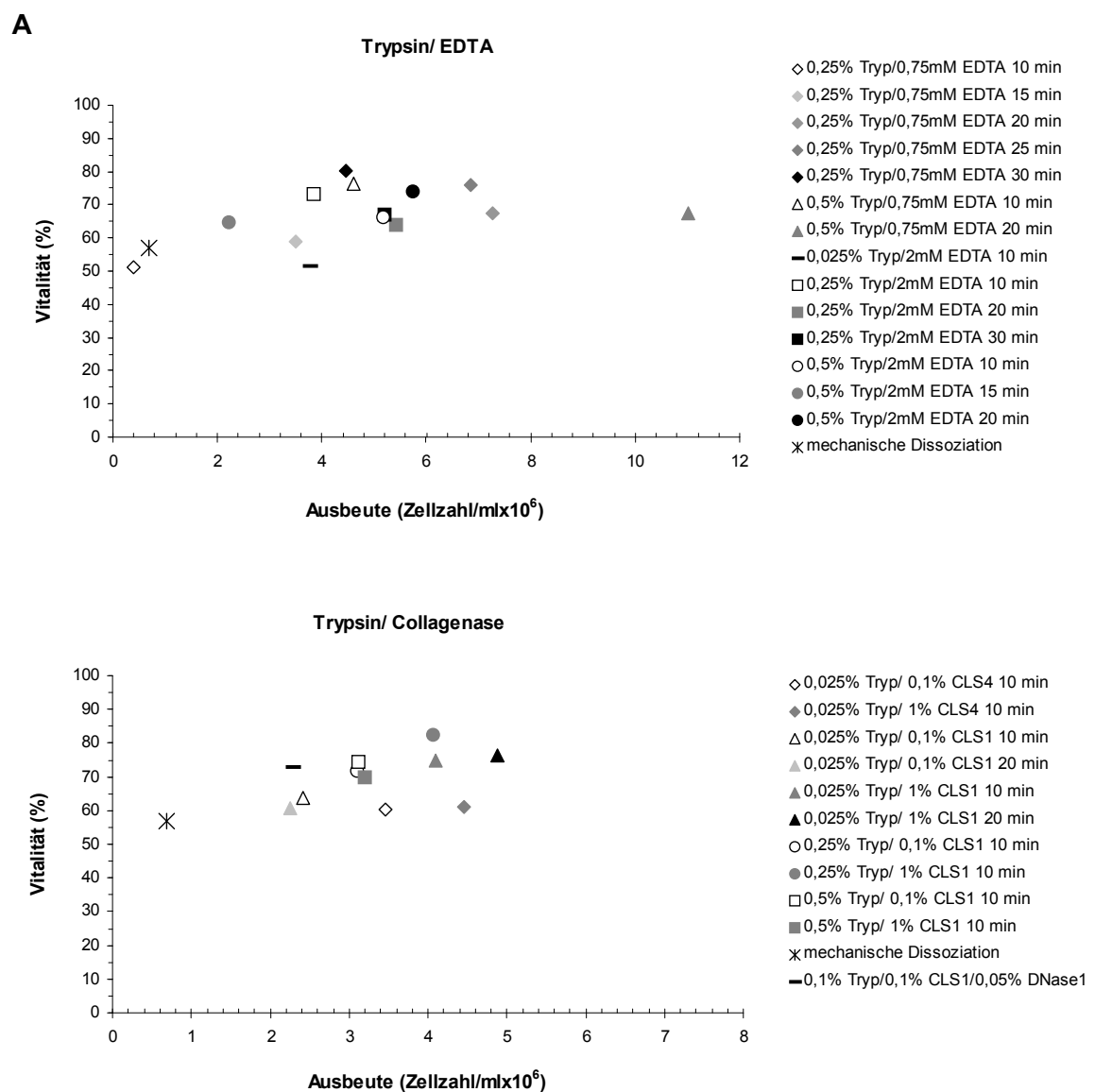
Zur Analyse des Expressionsprofils individueller isolierter Riechsinneszellen ist eine Amplifikation der zuvor synthetisierten cDNA mittels PCR nötig, da von Einzelzell-Mengen polyadenylierter RNA ausgegangen wird. Dieser Schritt ist kritisch für den Erfolg des gesamten Experimentes, da durch die extreme Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms die quantitative Repräsentation einzelner Transkripte im Gesamt-RNA-Pool stark verändert werden kann. Aber auch durch weitere Schritte des Gesamtverfahrens kann die getreue Abbildung des *in-vivo*-Transkriptoms der untersuchten Zelle in der cDNA-Tag-Bibliothek in Frage gestellt werden. Zur Vermeidung solcher Deformierungen bedarf es einer genauen Einstellung aller experimentellen Parameter vor allem für die Einzelzell-Methoden (Einzelzell-Isolierung, cDNA-Synthese, Tailing, PCR) und für die Klonierung der cDNA-Bibliothek. Die Ergebnisse dieser Etablierungsarbeit sind im Folgenden dargestellt.

#### **3.1.1 Etablierung eines Verfahrens zur effizienten und schonenden Dissoziation von Riechepithel zur Gewinnung von Einzelzellen**

Ein generelles Problem bei der Gewinnung von vereinzelt Neuronen ist die Durchtrennung neuritischer Zellfortsätze während der Gewebepräparation, was eine unvermeidbare Einschränkung der zellulären Integrität darstellt. Ziel der Optimierung war es daher, alle weiteren Zellschädigungen so gering wie möglich zu halten, also OSNs mit größtmöglicher Vitalität und Integrität zu gewinnen — eine wichtige Voraussetzung für möglichst intakte Einzelzell-mRNA. Das Riechepithel als direkt mit der Außenwelt in Kontakt stehendes mehrreihiges hochprismatisches Sinnesepithel zeichnet sich durch einen stabilen Zellverband mit ausgeprägter Barrierefunktion aus, der auf Zell-Zellverbindungen (tight junctions, adherens junctions, Desmosomen) im apikalen und der Basalmembran im basalen Teil beruht. Diese aus Zelladhäsions- und ECM-Proteinen bestehenden Strukturen lassen sich mechanisch, enzymatisch und durch Entzug zweiwertiger Kationen aufbrechen. Verschiedenste Dissoziationsbedingungen wurden

daher getestet, um eine effektive und vor allem schonende Vereinzelung des frühen postnatalen (P7/8) Riechepithels von *mOR37B-EGFP*- und *OMP-GFP*-Mäusen zu erreichen (Abb. 3.2). Parameter zur Beurteilung der getesteten Dissoziationsvarianten waren neben Zellausbeute und Vitalität auch die Morphologie der Zellen in der Einzelzellsuspension, die Ausbeute an OSNs gegenüber sonstigen Zellen des Epithels sowie die Schnelligkeit der Prozedur.

Die rein mechanische Vereinzelung des Riechepithels durch Triturieren mit feuerpolierten Pasteurpipetten lieferte mit lediglich ca. 57 % vitalen Zellen und einer Ausbeute von etwa  $0,7 \times 10^6$  Zellen/ml bei einem Gesamtvolumen von 0,1 ml (Abb. 3.2 A + B) ein unbefriedigendes Ergebnis.



**Abb. 3.2: Getestete Dissoziationsbedingungen zur Gewinnung von Einzelzellen aus Riechepithel der Maus.** Vitalität (%; nach Trypanblau-Methode) und Ausbeute (Zellzahl/ml  $\times 10^6$ ; Gesamtvolumen: 0,1ml) von Einzelzellen nach Dissoziation von früh-postnatalen Riechepithel mit (A) Trypsin/EDTA sowie (B) Trypsin/Collagenase 1 bzw. Trypsin/Collagenase 4.



Trypsin in verschiedenen Konzentrationen (0,025 %, 0,25 % und 0,5 %) und in Kombination mit EDTA (0,75 mM und 2 mM) wurde daraufhin zur Vereinzelung eingesetzt (Abb. 3.2 A). Eine akzeptable Dissoziation wurde hierbei erst nach längeren Inkubationszeiten (>15 min) sowie bei höheren Trypsinkonzentrationen ( $\geq 0,25$  %) erreicht. Lange Inkubationszeiten stellen jedoch in Bezug auf mögliche Transkriptomdeformationen ein Problem dar, sodass die Kombination Trypsin/ EDTA als ungeeignet erachtet wurde.

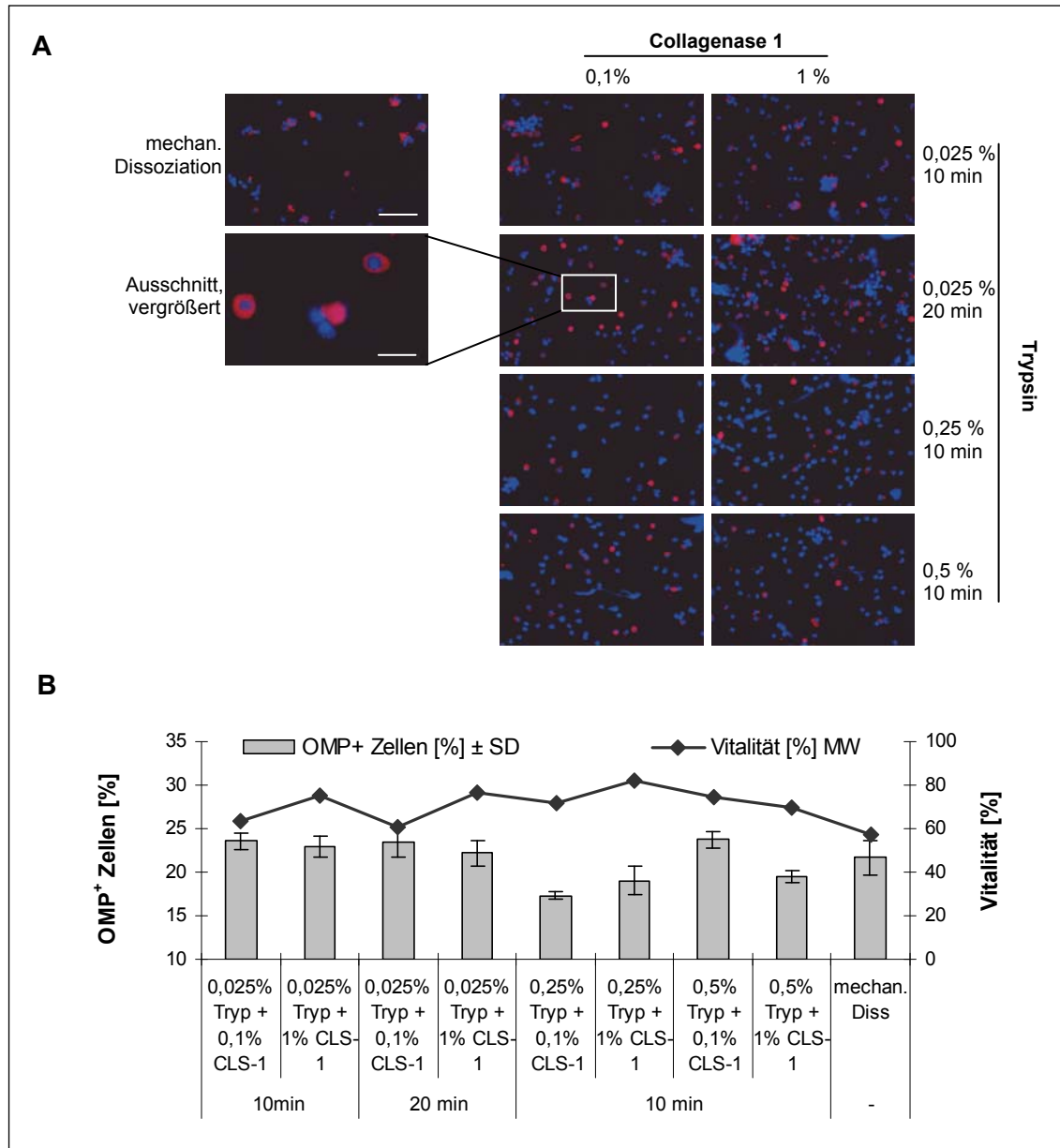
Zur Optimierung des Protokolls im Hinblick auf kürzere Inkubationszeiten wurden Kombinationen aus Trypsin und Collagenase 4 (CLS 4; Worthington Biochemical Corp., USA) bzw. Collagenase 1 (CLS 1; Worthington Biochemical Corp., USA) getestet (Abb. 3.2 B). Beide Enzympräparate besitzen neben ihrer kollagenolytischen Aktivität zusätzlich auch Caseinase-, Clostripain- und tryptische Aktivität, wobei CLS 4 eine um ein Vielfaches geringere tryptische Aktivität als CLS 1 aufweist. Insgesamt konnte durch den kombinierten Verdau mit Trypsin/Collagenase bereits nach kürzerer Inkubationsdauer (10 min) eine der Kombination Trypsin/EDTA vergleichbare Effizienz erreicht und somit eine besser geeignete Dissoziationsvariante gefunden werden. Aufgrund schlechterer Zellvitalitäten (max. 60 %) sowohl bei 0,1 % als auch bei 1 % fiel die Entscheidung gegen die Verwendung von CLS 4.

Zur Feineinstellung der ausgewählten Enzymkombination Trypsin/ CLS 1 wurde als zusätzliches Bewertungskriterium der Anteil reifer OSNs in der Einzelzellsuspension ermittelt, da diese Zellen aufgrund ihrer epithelial verankerten dendritischen und axonalen Fortsätze vermutlich am empfindlichsten gegen die Dissoziationsprozedur sind. Hierzu wurde eine Immunfärbung zum Nachweis des *Olfactory Marker Proteins* (OMP), einem Marker für reife OSNs, an den vereinzelt Zellen durchgeführt. Ein möglichst hoher prozentualer Anteil OMP-positiver Zellen in der Zellsuspension gekoppelt mit einer akzeptablen Vitalität wurde dabei als Maß für eine neuron-schonende Dissoziationsvariante angesehen.

Tendenziell zeigte sich, dass die Dissoziationswirkung bei sehr kleinen Trypsinkonzentrationen (bei Kombination mit 0,1 % CLS 1) zu gering ist, erkennbar an den vielen großen Zellaggregaten und wenigen Einzelzellen in der Suspension, bei sehr großen dagegen zu stark, da sich die Anteile OMP-positiver Zellen zum Teil sehr deutlich verringern (Abb. 3.3 A+B). Auch eine Erhöhung der CLS 1-Konzentration auf 1 % bewirkte trotz hoher Zellvitalitäten und -ausbeuten eher einen Rückgang OMP-positiver Zellen in der Suspension bei den getesteten Trypsinkonzentrationen (Abb. 3.3 A+B).

Resultierend aus den beschriebenen Beobachtungen erfolgte die enzymatische Dissoziation des letztlich für die Isolierung individueller OSNs verwendeten Riechepithels

mit 0,1 % Trypsin, 0,1 % Collagenase I und 0,05 % DNase I<sup>7</sup> in HBSS für 13 min bei 37°C. Die durchschnittliche Vitalität der Zellen lag bei 73 %, die Ausbeute bei durchschnittlich  $2,3 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$  Zellen/ml ( $n = 31$ , Gesamtvolumen: 0,1ml, Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.3: Feineinstellung der Dissoziationsparameter für die Enzymkombination Trypsin/Collagenase 1.** (A) Immunfärbung mit Antikörpern gegen *olfactory marker protein* (OMP) an vereinzelt Zellen des Riechepithels nach Dissoziation unter den angegebenen Bedingungen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen; Maßstab: 50 µm bzw. 10 µm (Ausschnitt). (B) Quantifizierung zu den in (A) gezeigten Bedingungen nach Auszählung von je 3 gleich großen repräsentativen Ausschnitten pro Aufnahme/Immunfärbung. Daten zur Vitalität aus Abb. 3.2 B.

<sup>7</sup> DNase I verdaut hochmolekulare, von lysierten Zellen stammende DNA und reduziert dadurch die Viskosität der Zellsuspension und somit Scherkräfte während der Vereinzelungsprozedur.

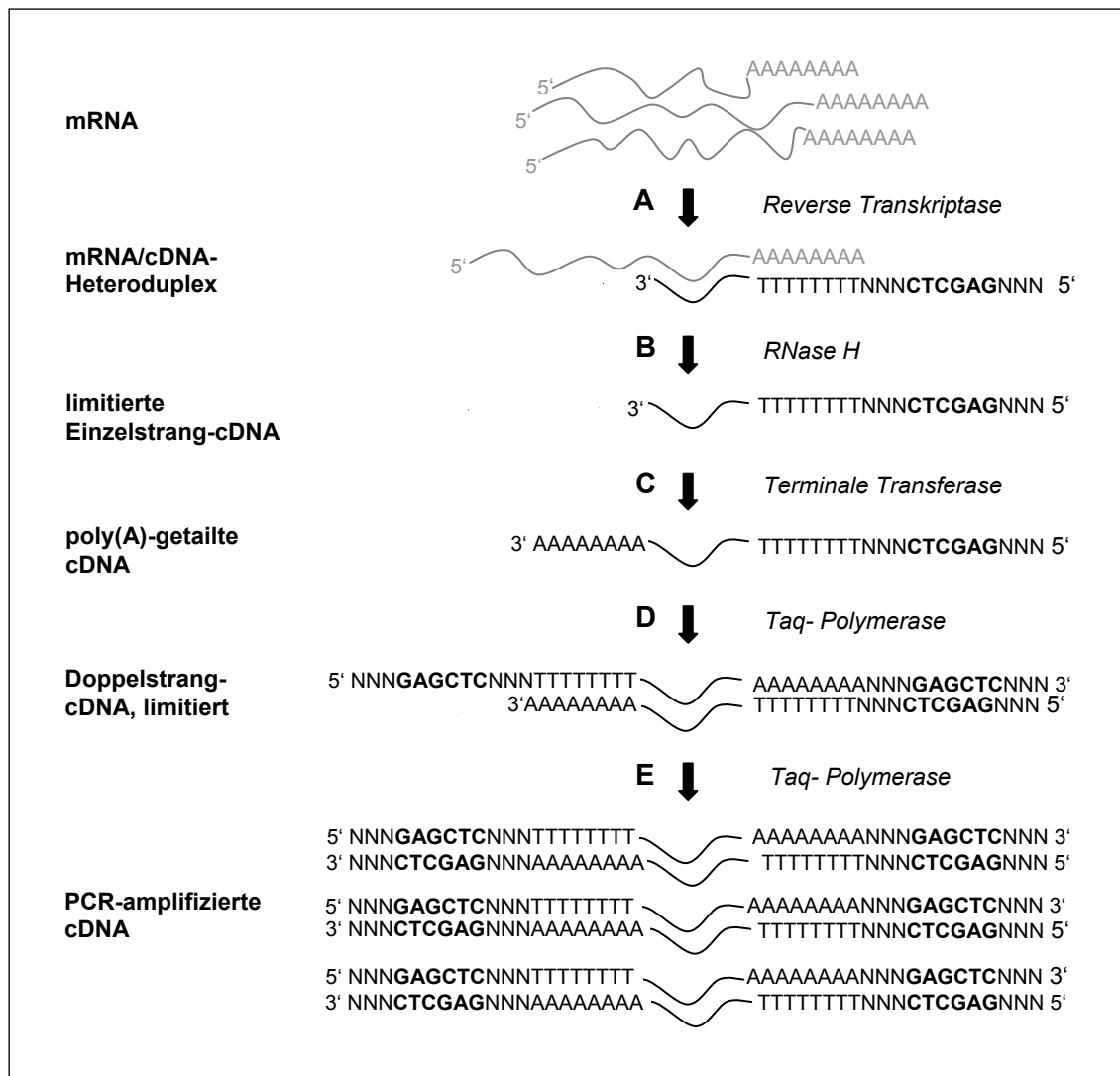
### 3.1.2 Entwicklung eines Protokolls für Synthese und Amplifikation einer transkriptom-treuen Bibliothek von 3'-cDNA-Tags aus einzelnen olfaktorischen Neuronen

Die komplexe Mehrschritt-Technik zur Transkriptom-treuen Herstellung einer Bibliothek von 3'-cDNA-Tags aus dem mRNA-Pool individueller OSNs setzt sich aus längenlimitierter reverser Transkription (RT, Schritt A), RNase-H-Verdau (Schritt B), Homopolymer-Tailing (Schritt C) und zwei aufeinander folgenden PCR-Amplifikationen (Schritt D + E) zusammen und beruht auf oligo(dT)-Priming (SR-T<sub>24</sub>-Primer) in cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation (Abb. 3.4). Die Reaktionen erfolgen dabei sequenziell im gleichen Reaktionsansatz ohne intermediäre Aufreinigung und damit nicht in ihren jeweiligen etablierten Optimal-Puffersystemen, was die Kontrolle der Teilreaktionen im Hinblick auf die Verträglichkeit der verschiedenen Puffersysteme und die Neueinstellung einzelner Reaktionsparameter zwingend notwendig macht. Inhomogene RNA-Populationen wie totale RNA bzw. mRNA aus totaler RNA erwiesen sich dabei anfänglich als ungeeignetes Ausgangsmaterial für diese Optimierungen, sodass zunächst mit einer synthetischen mRNA definierter Größe gearbeitet wurde.

Ausgehend von einem Plasmid, welches für die RNA des Zebrafisch-Geruchsrezeptors *ZOR8C2* kodiert (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Sigrun Korsching, Universität zu Köln), wurde mittels *in-vitro*-Transkription (IVT) die 1256 bp lange *ZOR8C2*-RNA synthetisiert. Sie enthält charakteristischerweise eine, in diesem Fall 70 bp lange Polyadenylierung an ihrem 3'-Ende, die als Template für die Bindung des SR-T<sub>24</sub>-Primers diente und Voraussetzung für die Synthese von Erststrang-cDNA durch Reverse Transkriptase war (Abb. 3.5 A).

Für die nachfolgende 3'-Polyadenylierung (Tailing) der Erststrang-cDNA musste diese zwingend einzelsträngig vorliegen, was durch Verdau der im RNA/cDNA-Hybrid noch vorhandenen RNA mit RNase H realisiert wurde. Im Anschluss wurde durch kontrolliertes polyA-Tailing der Erststrang-cDNA mit Terminaler Transferase die Bindung des SR-T<sub>24</sub>-Primers, damit die Synthese von Zweitstrang-cDNA und schließlich die Amplifikation der so entstandenen Doppelstrang-cDNA durch PCR ermöglicht. Problematisch gestaltete sich hierbei die Vereinbarkeit des Tailing-Puffers, der Kakodylat (Dimethylarsinat) und CoCl<sub>2</sub> enthielt, mit den Komponenten der anderen Reaktionen. Nach Austausch durch Kaliumphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM)- bzw. Kaliumacetat-Puffer (NEB; 20 mM Tris-Acetat, 50 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, pH 7,9 bei 25°C) konnte jedoch erfolgreiches Tailing gezeigt werden. Hierzu wurde polyadenylierte Erststrang-cDNA mit *ZOR8C*-sense-RNA-Sonden und die nur bei erfolgreichem Tailing entstehende Zweitstrang-cDNA mit *ZOR8C*-antisense-RNA-Sonden im Southern-Blot nachgewiesen (Abb. 3.5 B). Obwohl beide Puffervarianten keine markante Bandenverlagerung nach oben durch das Tailing

erkennen ließen, führten sie zur Bildung von Zweitstrang-cDNA. Aufgrund der höheren Ausbeute an Zweitstrang-cDNA wurde  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer als Tailingpuffer für die Einzelzell-RT-PCR verwendet.



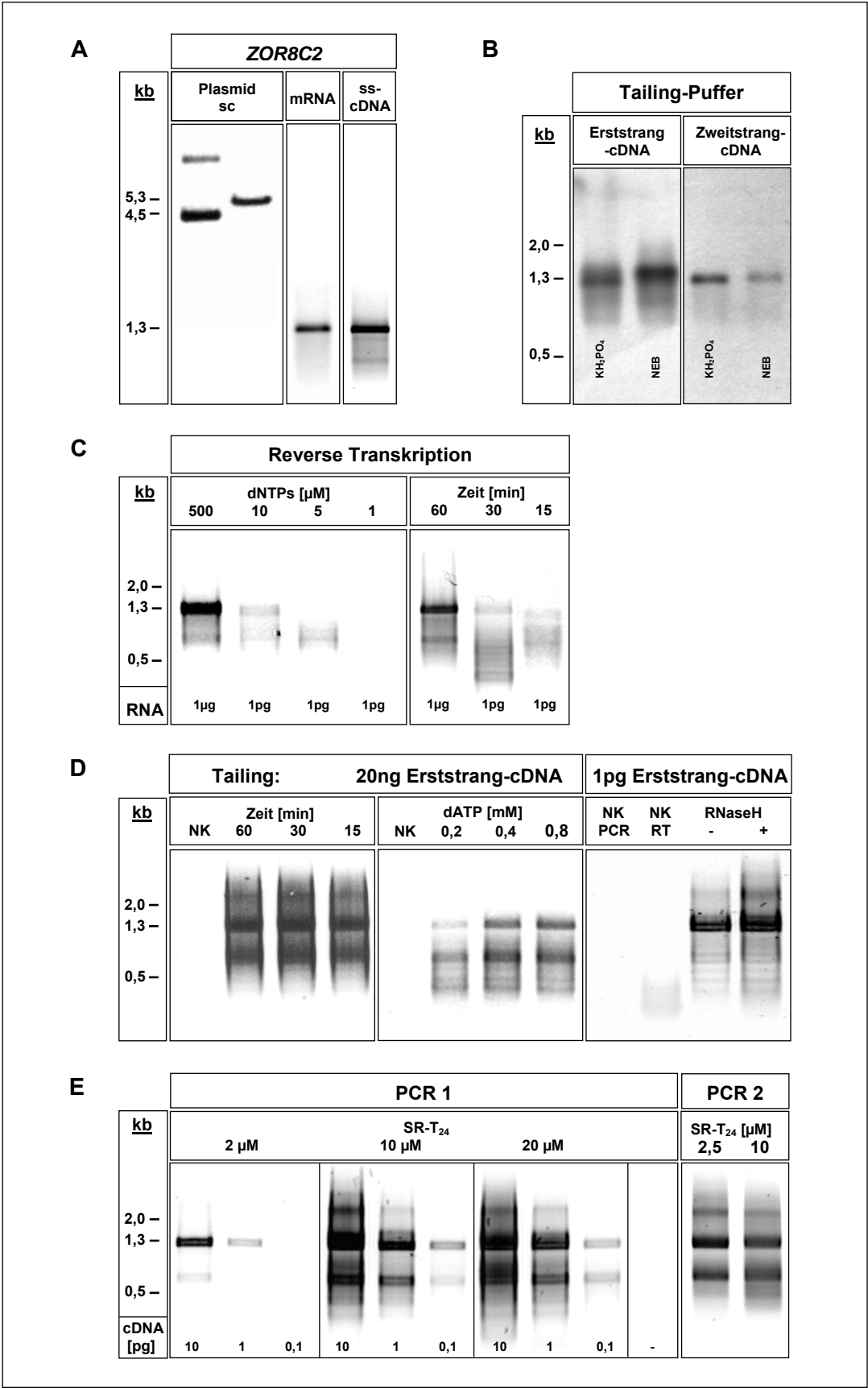
**Abb. 3.4:** Schema des Verfahrens zur Synthese und Amplifikation von 3'-cDNA-Tags aus einzelnen Zellen. (A) reverse Transkription, (B) RNase-H-Verdau, (C) Homopolymer-Tailing, (D+E) Zweitstrangsynthese und PCR-Amplifikation.

Nach einer ersten qualitativen Beurteilung von reverser Transkription, RNase-H-Verdau und Homopolymer-Tailing — jeweils unter Standard-Bedingungen durchgeführt — wurden alle Teilreaktionen quantitativ eingestellt und auf Einzelzell-Niveau gebracht. Die Limitierung der *ZOR8C2*-Erststrang-cDNA auf eine Länge < 1000 bp erfolgte während der reversen Transkription und wurde hauptsächlich über eine deutliche Verringerung der Nukleotidkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  auf 5  $\mu\text{M}$  je Nukleotid und zusätzlich durch Verkürzung der Reaktionszeit auf 15 min erreicht (Abb. 3.5 C). Diese Limitierung war notwendig, um Verschiebungen der mRNA- Repräsentation im ursprünglichen RNA-Pool der Zelle, wie sie durch PCR entstehen können, zu vermeiden (siehe 3.1.3). Unterschiede der Template-

Längen sind der wichtigste Einflussfaktor auf die Amplifizierbarkeit durch PCR. Für die weiteren in Abb. 3.5 gezeigten Experimente wurde die Längen-Limitierung jedoch noch nicht übernommen. Darüber hinaus war die Konzentration des SR-T<sub>24</sub>-Primers in der RT eine wichtige Stellgröße. Zu viel und damit überschüssiger Primer birgt die Gefahr, während der Tailing-Reaktion ebenfalls polyadenyliert und damit durch PCR amplifizierbar zu werden, zu wenig Primer führt hingegen zu ineffizienter reverser Transkription aller mRNA-Spezies und damit eventuell auch zu einer Verschiebung in der Repräsentation des Einzelzell-Transkriptoms durch Verlust rarer Spezies. Für die Limitierung von ZOR8C2-cDNA ausgehend von 1 pg ZOR8C2-RNA (Einzelzell-Äquivalent) wurde eine berechnete Primerkonzentration von 5 pM (10-fach in Bezug auf freie 3'-RNA-Enden) eingesetzt. Zur Optimierung des Tailings wurden ausgehend von einer Standard-Reaktion (25 µl-Ansatz, 20 ng ss-ZOR8C2-cDNA, 0,2 mM dATP, 60 min, 37 °C) dATP-Konzentration und Reaktionszeit in Anlehnung an beschriebene Protokolle (Dulac und Axel, 1995; Iscove et al., 2002) variiert (Abb. 3.5 D). Gezeigt ist die ZOR8C2-cDNA nach der ersten PCR-Amplifikation über 35 Zyklen. Die Verkürzung der Reaktionszeit bis auf 15 min führte lediglich zu einer minimalen Reduktion der cDNA-Ausbeute und wurde für alle weiteren Experimente übernommen. Eine Erhöhung der dATP-Menge auf bis zu 800 µM resultierte dagegen in deutlich mehr *full-length* cDNA (~ 1,3 kb) nach den ersten 35 PCR-Zyklen, was wahrscheinlich auf durch dATP-Überschuss homogenere poly(A)-Tails zurückzuführen ist und wurde ebenfalls übernommen.

---

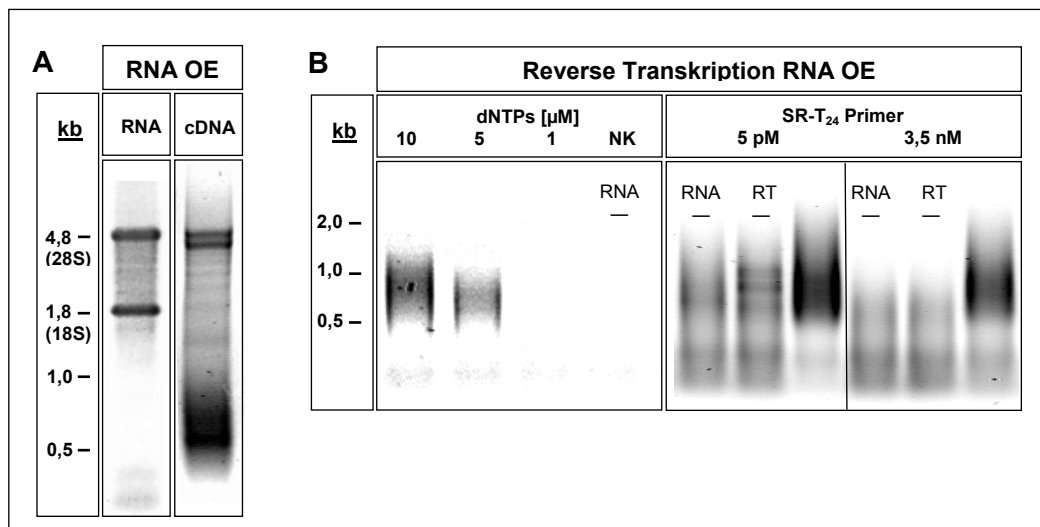
**Abb. 3.5: Etablierung und Optimierung des Einzelzell-RT-PCR-Protokolls an synthetischer ZOR8C2-RNA.** (A) Je 100 ng supercoiled (sc) und mit *NotI* linearisiertes (lin) ZOR8C2-Plasmid; je 150 ng ZOR8C2-RNA, hergestellt durch IVT, und ZOR8C2-Erststrang-cDNA nach reverser Transkription (RT, Standard-Bedingungen; Verdau mit RNaseA+RNaseH). (B) Nachweis von Erststrang- und Zweitstrang-cDNA nach Tailing durch Hybridisierung mit digoxigeninmarkierten ZOR8C2-sense- bzw. antisense-RNA-Sonden im Southern Blot. (C) Limitierung der RT durch Reduktion der Nukleotidkonzentration (Vergleich von Standard-RT mit 1 µg ZOR8C2-RNA, 0,5 mM dNTPs, 2 µM SR-T<sub>24</sub>-Primer für 60 min und limitierter RT ausgehend von 1 pg ZOR8C2-RNA mit 5 pM Primer, 10/5/1 µM dNTPs für 15 min) sowie Verkürzung der Reaktionszeit (ausgehend von 1 pg ZOR8C2-RNA, 5 pM SR-T<sub>24</sub>-Primer, 10 µM dNTPs, 60/30/15 min). Aufgetragen ist das Produkt nach der 1. PCR. (D) Optimierung der Tailing-Reaktion über Reaktionszeit und dATP-Konzentration (getailte ZOR8C-cDNA nach erster PCR-Amplifikation; NK: ohne cDNA) sowie optimiertes Tailing von Erststrang-cDNA im Einzelzell-Maßstab in Gegenwart aller Reaktionskomponenten aus RT (RNaseH-) bzw. RT und RNase-H-Verdau (RNaseH+); NK RT: RT-Komponenten ohne cDNA, NK PCR: PCR ohne cDNA. (E) Optimierung von PCR 1 (35 Zyklen) und PCR 2 (30 Zyklen) durch Variation von Primerkonzentration (2/10/20 µM SR-T<sub>24</sub>) und eingesetzter Template-Menge (0,1/1/10 pg polyadenylierte ds-cDNA). kb: Länge in Kilobasen



Wie bereits die reverse Transkription wurde schließlich auch die Tailing-Reaktion auf Einzelzell-Niveau (5 µl RT-Ansatz, 1 pg cDNA) herunterskaliert. Weder die Reaktionskomponenten aus RT allein (RNaseH-) noch RT und RNaseH-Verdau zusammen (RNaseH+) beeinträchtigten die im selben Reaktionsansatz durchgeführte Tailing-Reaktion. Zudem konnten PCR-bedingte Artefakte (NK PCR) ebenso wie ein signifikantes Tailing des SR-T<sub>24</sub>-Primers in Abwesenheit von cDNA (NK RT) ausgeschlossen werden. Um genügend cDNA-Material für die Herstellung von Bibliothek und Sonden zur Verfügung zu haben, waren zwei PCR-Amplifikationsrunden nötig. Für die erste PCR (35 Zyklen) wurde eine einzusetzende Primermenge von 10 µM aufgrund optimaler cDNA-Ausbeuten und für PCR 2 (30 Zyklen) von 2,5 µM ermittelt (Abb. 3.5 E).

Das anhand von *ZOR8C2*-RNA etablierte und optimierte Einzelzell-RT-PCR-Protokoll wurde schließlich auf gemischte RNA-Populationen übertragen. Einzelzell-Äquivalente totaler RNA (10 pg) aus olfaktorischem Epithel wurden eingesetzt, um den späteren Einsatz individueller OSNs zu simulieren. Ausgehend von einer konventionellen Menge an Gesamt-RNA revers transkribierte cDNA zeigte im Agarosegel einen typischen Schmier, der von wenigen hundert Basenpaaren bis hin zu mehreren Kilobasen reicht und die Größenverteilung zellulärer mRNAs widerspiegelt (Abb. 3.6 A). Zur Vermeidung einer disproportionalen Amplifikation kürzerer cDNAs durch PCR wurden analog zur *ZOR8C2*-cDNA cDNAs aus Gesamt-RNA mit einer Länge von ~ 500-1500 bp durch Limitierung der RT hergestellt (Abb. 3.6 B). Jedoch stellte sich die für *ZOR8C2*-RNA optimale Nukleotidkonzentration von 5 µM aufgrund deutlicher Ausbeute-Verluste als zu gering für die Synthese von limitierter Einzelzell-cDNA heraus, so dass hier 10 µM dNTPs eingesetzt wurden. Die für Ausgangsmaterial von 1 pg *ZOR8C2*-mRNA berechnete Konzentration von 5 pM SR-T<sub>24</sub>-Primer wurde ebenfalls nach oben auf 3,5 nM (aus Iscove et al. (2002)) korrigiert, da hier ein deutlich kürzerer Schmier in den Negativkontrollen ohne RNA-Template (RNA-) bzw. ohne Reverse Transkriptase (RT-) zu beobachten war. Falls diese, in den Negativkontrollen beobachteten Artefakte in revers transkribierter und amplifizierter cDNA (RT+) überhaupt vorkommen, dann in allen Amplifikaten in gleicher Weise, sodass sie später beim differenziellen Screening der cDNA-Bibliothek als nicht differenzielle Klone identifiziert würden.

Des Weiteren wurde die Tailing-Reaktion im Gegensatz zum etablierten *ZOR8C2*-Protokoll für die erste PCR in drei parallelen Ansätzen prozessiert und nach Vereinigung der zweiten PCR-Amplifikation unterzogen (siehe 2.3.2). Diese Maßnahme sollte ebenfalls zu einer Verminderung von Repräsentationsverschiebungen beitragen. Mit dem hier erarbeiteten Protokoll konnten ca. 6 µg amplifizierte cDNA hergestellt werden, was ausgehend von der mRNA-Menge einer einzelnen Zelle (~ 0,5 pg) einer  $3 \times 10^7$ -fachen Amplifikation entspricht.



**Abb. 3.6: Anwendung des optimierten Einzelzell-RT-PCR-Protokolls auf Einzelzell-Äquivalente totaler RNA aus Riechepithel (OE).** (A) 2  $\mu$ g Gesamt-RNA aus OE; cDNA von 1  $\mu$ g Gesamt-RNA aus OE (DNase +, RNeasy-Aufreinigung, Standard-RT mit oligo(dT)<sub>12-18</sub>). (B) Optimierung der limitierten RT im Einzelzell-Maßstab durch Variation von Nukleotid- (10 pg Gesamt-RNA aus OE, 10/5/1  $\mu$ M dNTPs, 15 min; NK: RT mit 10  $\mu$ M dNTPs, ohne RNA) und Primerkonzentration (10 pg Gesamt-RNA aus OE, 10  $\mu$ M dNTPs, 5 pM bzw. 3,5 nM SR-T<sub>24</sub>-Primer, 15 min). Auftrag zeigt Produkt nach 2. PCR. RNA - : RT ohne RNA; RT - : H<sub>2</sub>O statt Reverser Transkriptase.

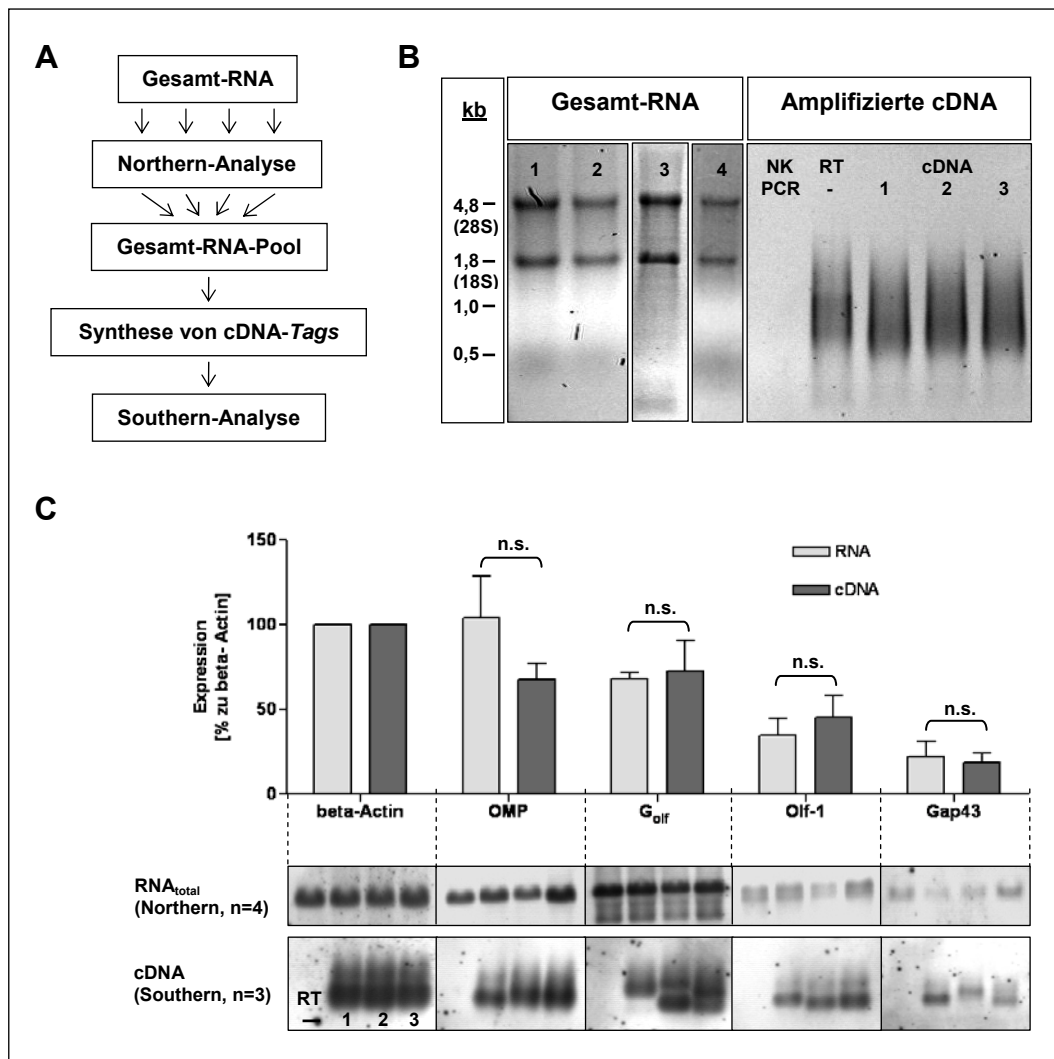
### 3.1.3 Nachweis der transkriptom-treuen Amplifizierung der Einzelzell-cDNA-Tags

PCR-basierte Amplifikationsstrategien an Gesamttranskriptomen haben den großen Nachteil, dass sie verschiedene Sequenzen aufgrund von Differenzen in Länge und Basenzusammensetzung mit unterschiedlicher Effizienz amplifizieren und somit die Abundanzbeziehungen im Transkriptom einer Zelle verzerren können (Dulac und Axel, 1995; Iscove et al., 2002). Diesen Effekt zu vermeiden, war Ziel der Optimierung des im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Protokolls.

Um die Transkriptomtreue dieser Methode zu überprüfen, wurden die Expressionsprofile eines Haushaltsgens und von ausgewählten und für OSNs charakteristischen Genen (beta-Actin, OMP, G<sub>olf</sub>, Olf-1, Gap43) in Gesamt-RNA aus Riechepithel und aus Einzelzell-Äquivalenten daraus amplifizierter cDNA durch Northern- bzw. Southern-Analyse ermittelt und miteinander verglichen (Abb. 3.7 A). Dies geschah, indem die Gesamt-RNA bzw. amplifizierte cDNA-Tags aus Einzelzelläquivalenten dieser Gesamt-RNA (Abb. 3.7 B) auf positiv geladene Nylonfilter übertragen und durch Hybridisierung mit den entsprechenden DIG-markierten antisense-RNA-Sonden analysiert wurden (Abb. 3.7 C). Neben dem Haushalts-Gen beta-Actin waren die olfakto-spezifischen Transkripte für OMP und G<sub>olf</sub> erwartungsgemäß stark, der Transkriptionsfaktor Olf-1 sowie Gap-43 als Marker für unreife



OSNs eher schwach in der Gesamt-RNA aus Riechepithel repräsentiert. Vier unabhängige RNA-Präparationen wurden hierfür analysiert.



**Abb. 3.7: Nachweis der transkriptom-treuen Synthese und Amplifikation von Einzelzell-cDNA-Tags.** (A) Fließschema zum experimentellen Ablauf. (B) Qualitative Analyse der verwendeten RNA-Präparationen im denaturierenden Agarosegel (je 2 µl Gesamt-RNA aus OE, entsprechend 2,4-3,2 µg) sowie der aus Einzelzell-Mengen des RNA-Pools amplifizierten cDNA nach Auftrennung im Agarosegel (NK PCR: PCR ohne Template; RT - : RT ohne Enzym). (C) Vergleich der Expressionsprofile für beta-Actin, OMP, Golf, Olf-1 und Gap-43 in Gesamt-RNA (je 5 µg, n=4) und amplifizierter cDNA (je 5 µl, n=3) nach Hybridisierung mit DIG-markierten antisense-Ribosonden. Die statistische Auswertung erfolgte nach densitometrischer Quantifizierung der Chemiluminographien mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test (MW ± SD;  $p > 0,05$ ).

Eine Mischung gleicher Volumenanteile dieser vier RNA-Präparationen diente anschließend als Ausgangsmaterial für die Synthese und Amplifikation von längen-limitierter cDNA im Einzelzell-Maßstab, die in drei unabhängigen Reaktionen durchgeführt wurden. Die resultierende cDNA wies reproduzierbar eine Länge von ~ 500-1500 bp auf. In der Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase (RT -) waren trotz des deutlichen Schmiereffekts im Agarosegel keine Transkripte im Southern-Blot nachweisbar, was für transkript-unabhängige und deshalb hier belanglose Artefakte spricht (Abb. 3.7 B). Erfreulicherweise führte die extreme Amplifikation der cDNA durch insgesamt 65 PCR-

Zyklen nicht zu signifikanten Unterschieden in der quantitativen Repräsentation der exemplarisch analysierten Transkripte im Vergleich zu nativer, nicht-amplifizierter Gesamt-RNA (t-Test, ungepaart, zweiseitig;  $p > 0,05$ ). Somit konnte von einer transkriptom-treuen Amplifikationsmethode ausgegangen werden, wenngleich signifikante Veränderungen bei anderen Transkripten aufgrund der geringen Zahl analysierter Gene natürlich nicht auszuschließen waren.

### 3.1.4 3R-Ligation: Kontrollierte Klonierung komplexer 3'-cDNA-Tags

Im nächsten Schritt ist es erforderlich, die zuvor hergestellte transkriptomtreue Population von 3'-cDNA-Tags aus mOR37B<sub>unreif</sub>-Zellen effizient, aber ohne Deformation der Repräsentation in einen Klonierungsvektor zu ligieren, um sie anschließend in Bakterien klonieren zu können.

Die Ligation von DNA-Fragmenten ist eine Reaktion von unterschätzter Komplexität. Wenn im allgemeinen Fall Vektor V und Insert I kompatibel homobifunktionell sind, können bei der Ligation nämlich zumindest theoretisch unendlich viele verschiedene Produkte (zirkulär $V_nI_m$  und linear $V_nI_m$  mit  $n, m = 0, 1, \dots$ ) entstehen. Von diesen ist jedoch nur das Produkt zirkulärVI (also  $n = m = 1$ ) erwünscht. Hinzu kommt, dass die zu Beginn noch unerwünschte *intramolekulare* Zirkularisation sogar gegenüber der zuerst alleine nötigen *intermolekularen* Ligation begünstigt ist, und zwar umso mehr je kürzer das ligierte DNA-Fragment ist. Standard-Klonierungsverfahren nutzen verschiedene Mittel, um diese Komplexität zu reduzieren und die Reaktion praktikabel zu machen. Zum einen verwendet man bevorzugt heterobifunktionelle DNA-Fragmente („gerichtete Klonierung“; V und I werden mit dem gleichen Paar von Restriktionsenzymen behandelt). Auf diese Art verhindert man die Zirkularisation der Monomere (genauer aller ungeradzahligen Oligomere). Sie stehen somit verstärkt und schon bei niedrigeren Konzentrationen für die intermolekulare Reaktion zur Verfügung. Klonierbare zirkuläre Vektormonomere, die stark zum Klonierungshintergrund beitragen würden, werden nicht mehr gebildet. Wenn man nur eine bestimmte Insertspezies klonieren möchte, verwendet man außerdem einen molaren I-Überschuss. Dadurch gehen zwar I-Moleküle durch II-Reaktion verloren, aber VI-Reaktionen werden gegenüber VV-Reaktionen begünstigt. Muss eine ganze Population von verschiedenen Insertspezies kloniert werden (z.B. konventionelle cDNA-Bibliothek), verwendet man dagegen einen molaren V-Überschuss. Hierdurch werden zwar zirkularisierbare VV-Dimere gebildet, aber die Gefahr I-Spezies zu verlieren, wird reduziert. Die Zirkularisation von VV-Dimeren, die zum Klonierungshintergrund beitragen würden, wird schließlich meist noch durch Dephosphorylierung des Vektors verhindert. Wegen der starken Produktinhibition dieser Reaktion ist die Dephosphorylierung und damit die Reduktion des Klonierungshintergrundes jedoch oft nur begrenzt effizient.

Im vorliegenden Fall sind diese konventionellen Strategien wenig Erfolg versprechend. Wegen der Syntheseprozedur der 3'-cDNA-*Tags* (Verwendung nur eines Primers bei der PCR) sind die Ligationspartner notwendigerweise homobifunktionell. Die für die Ligation von ganzen I-Populationen übliche Strategie, mit einem V-Überschuss zu arbeiten, ist nicht sinnvoll: Es droht starke Bildung von Klonierungshintergrund aus zirkulärV<sub>n</sub>-Produkten, weil einerseits die als Inserts fungierenden *Tags* wegen ihrer Kürze besonders stark zur Zirkularisation neigen, also wenig für die intermolekulare Ligation zur Verfügung stehen und andererseits die begünstigte, aber unerwünschte V-Selbstligation nur durch ineffiziente Dephosphorylierung, aber nicht durch Inkompatibilität der Restriktionsenden verhindert wäre.

Gleichzeitig mit diesen erhöhten Schwierigkeiten sind im vorliegenden Fall die Anforderungen besonders hoch:

- Die Reaktion muss „*unbiased*“ verlaufen, sodass das in der cDNA repräsentierte Transkriptom treu in den rekombinanten klonierbaren Plasmidprodukten und damit schließlich in den Klonen der Bibliothek abgebildet wird.
- Sie muss effektiv sein, sodass alle, also auch rare cDNA-Spezies, entsprechend ihrer Häufigkeit unter den rekombinanten klonierbaren Produkten repräsentiert sind.
- Die Bildung von klonierbaren Produkten mit multiplen Inserts muss vermieden werden, da sie zu falsch negativen Ergebnissen bei differenzieller Hybridisierung führen können.
- Der Anteil klonierbarer Produkte ohne Insert (Leervektoren) muss aus Gründen der Screening-Effizienz nahe Null liegen.

Aus diesen Gründen wurde hier ein neuartiges rationales Verfahren entwickelt, das es ermöglichen soll, zirkulärVI als nahezu einziges klonierbares Reaktionsprodukt zu erzeugen. Die Methode wird im Folgenden als *Route and Rate Restricted (3R)* – Ligation bezeichnet. Konzeptionell beruht sie auf folgenden Ideen:

- Alle Produkte mit VV-Bindungen werden eliminiert, indem simultan zur Ligation (und nochmals ganz am Ende der Synthese) ein Restriktionsenzym zugesetzt wird, das sie zerstört. Die I-Population wird dagegen mit einem anderen, aber end-kompatiblen Restriktionsenzym geschnitten, so dass VI-Bindungen gebildet, aber nicht durch den simultanen Verdau angegriffen werden können. Produkte mit II-Bindungen werden ausgeschlossen, indem die I-Population dephosphoryliert wird.
- Der damit einzig verbleibende Reaktionstyp, nämlich die Ausbildung von VI-Bindungen wird kinetisch „gebahnt“, indem V und I in so hohen Konzentrationen eingesetzt werden, dass inter- gegenüber intramolekularen Interaktionen begünstigt sind.

- Die VI-Reaktion wird abgebrochen, ehe sich in signifikantem Ausmaß größere als dimere Produkte gebildet haben. In der Reaktionsmischung liegen dann praktisch ausschließlich die Edukte V, I und das Produkt linearVI vor.
- Zur Zirkularisation wird anschließend so drastisch verdünnt, dass nun die intra- gegenüber der intermolekularen Reaktion begünstigt ist. Da sich zirkulärI fast nicht bilden kann (Dephosphorylierung) und zirkulärV in einem abschließenden Nachverdau wieder linearisiert wird, entsteht so zirkulärVI als nahezu exklusives klonierbares Produkt.

Alle quantitativen Überlegungen, die zur Realisation der 3R-Ligation erforderlich sind, finden sich in Material und Methoden (2.3.3).

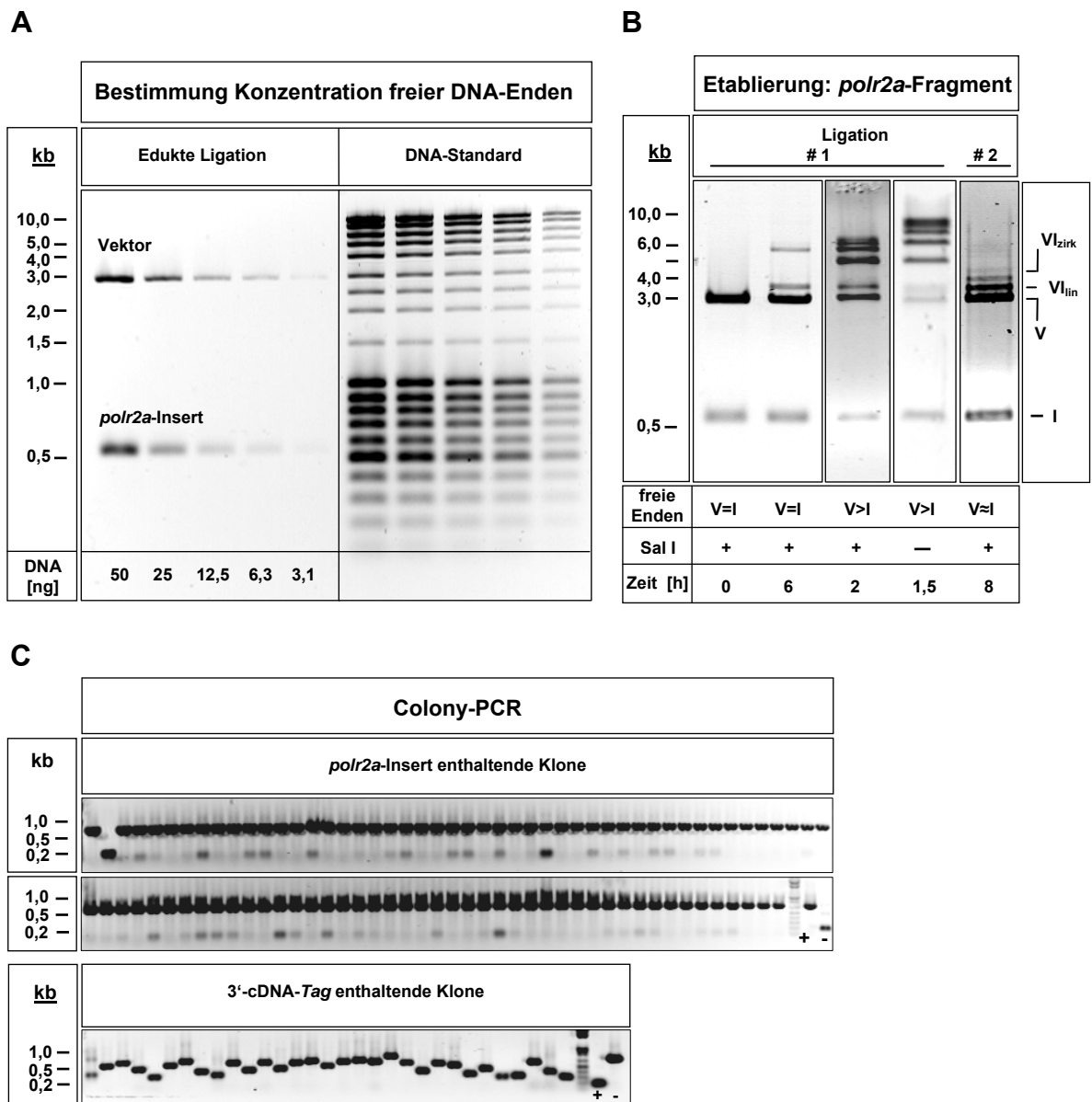
### *Experimentelle Umsetzung*

Die Etablierung eines Protokolls für die 3R-Ligation erfolgte zunächst unter Verwendung eines 532 bp langen cDNA-Inserts aus der kodierenden Sequenz des Polypeptids A der RNA-Polymerase II (*polr2a*; Nukleotid 412-944) und des Vektors pBluescript I KS. Die theoretisch vorhergesagten und durch umfangreiche Parametervariation (Daten nicht gezeigt) im Wesentlichen bestätigten Idealbedingungen dieser Reaktionsfolge waren die Folgenden: Für die Erstligation wurden je 140 nM (freie Enden) *Sal*-I-geschnittener Vektor und 140 nM (freie Enden) *Xho*-I-geschnittenes, CIP-dephosphoryliertes Insert in Ligationspuffer mit 100 mM NaCl versetzt (wird für die simultane Restriktion benötigt) und in Gegenwart von 130 *cohesive end ligation units* (celu) T4-DNA-Ligase (NEB) und 80 U *Sal* I (NEB) bei 25°C für 2 h inkubiert (Ansatzvolumen: 10 µl). Nach thermischer Inaktivierung wurde der Ansatz mit Ligationspuffer 1:100 verdünnt. Die intramolekulare Zirkularisation erfolgte im Anschluss nach Zugabe von 27.000 celu T4-DNA-Ligase für 16 h bei 16°C. Nach erneuter thermischer Inaktivierung wurden vorhandene Leervektoren durch 100x Überverdau mit *Sal* I linearisiert, die Reaktionsprodukte über eine Silicagel-Säule (Qiagen) aufgereinigt und zur Transformation eingesetzt.

Für eine erfolgreiche kinetische Kontrolle der Reaktion müssen die eingesetzten Konzentrationen von V und I wohl definiert sein. Es hat sich gezeigt, dass hierzu die Genauigkeit von UV-Konzentrationsbestimmungen, wahrscheinlich wegen ihrer Anfälligkeit für Kontaminanten, nicht immer ausreichend war. Die genauen Konzentrationen von I und V wurden daher an Hand von gelelektrophoretisch analysierten Verdünnungsreihen durch Vergleich mit mengen-geeichten Molekulargewichtsstandards bestimmt (Abb. 3.8 A). Da die relevanten Konzentrationen Konzentrationen freier Enden und nicht DNA-Konzentrationen sind, wurde die PCR bei der Synthese der Inserts mit einem ausführlichen Extensionsschritt (10 min, 72°C) beendet, um möglichst keine Abbruchsprodukte, die bei der nachfolgenden Restriktion nicht in reaktive Enden umgewandelt werden zu erzeugen.

Der Erfolg dieser Maßnahme wurde durch Analyse der Enden der PCR-Produkte (Daten nicht gezeigt) bestätigt. Beide Reaktanten sollten zur intermolekularen Ligation idealerweise äquimolar eingesetzt werden, da sonst die Effizienz der Reaktion sinkt, weil unproduktive und/oder ATP-verbrauchende V-V- oder I-I-Interaktionen dominieren. Den drastischen Effekt debalancierter V:I-Verhältnisse auf die Bildung unerwünschter, hochmolekularer  $V_n$ - bzw. VI-Polymere verdeutlicht Abb. 3.8 B (Spuren 3 + 4 von links).

Obwohl sich die oben genannten Reaktionsparameter in der Praxis als funktionell erwiesen, wurde der tatsächliche Reaktionserfolg der beiden Teil-Ligationen im Einzelfall gelelektrophoretisch kontrolliert, um gegebenenfalls nachzuregulieren, da die Aktivitäten von individuellen Enzym- und Puffer-Präparationen voneinander abweichen können. Der Reaktionsfortschritt der intermolekularen Ligation war dabei gut kontrollierbar: V und I sollten je zu etwa 1/3 abreagiert haben, dabei sollte praktisch nur linear VI (hier 3,5 kb) gebildet worden sein (Abb. 3.8 B, Spuren 1 + 2 von links). Durch kontrolliertes DNase-I-Nicking des klonierten *supercoiled*-Produktes wurde festgestellt, dass das bei der intramolekularen Ligation entstehende zirkuläre VI-Produkt unter den hier verwendeten gelelektrophoretischen Bedingungen (0,7 % Agarose, TBE) eine scheinbare Länge von 4,5 kb aufweist (Abb. 3.8 B, rechte Spur). Es entsteht in deutlich geringeren Mengen als theoretisch zu erwarten war. Experimentelle Variationen der Ligasemenge bei der Zirkularisation über weite Konzentrationsbereiche brachten keine Verbesserung (Erhöhung) oder sogar Verschlechterungen (Erniedrigung) (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise bilden sich IVI- (4 kb) und VIV-Produkte (6,5 kb) leichter, obwohl dabei die gleiche Bindung wie bei der Zirkularisation ausgebildet werden muss und obwohl durch den intermediären Verdünnungsschritt die Restkonzentrationen von V und I etwa um einen Faktor 10 unter die Selbstzirkularisations-Konzentration von VI gebracht worden war. Die Zirkularisation ist also durch zusätzliche Effekte inhibiert. Möglicherweise kommt es bei den hohen erforderlichen Ligase-Konzentrationen zu einer Dekoration der linearen DNA mit Enzymmolekülen, die ihre Flexibilität herabsetzt. Angesichts der hohen Kompetenz der zur Transformation verwendeten Bakterien ( $>10^6$  cfu/ng) ist die absolute Ausbeute an zirkulärem VI jedoch von geringerer Bedeutung, denn es ist die einzige, in signifikanten Mengen vorliegende klonierbare Komponente der Reaktionsmischung.



**Abb. 3.8: Etablierung der 3R-Ligation. (A)** Ermittlung äquimolarer Konzentrationen an freien DNA-Enden von Vektor (V; pBluescript I KS, *Sal*I-geschnitten) und Insert (I; *polr2a*-Fragment, *Xho*I-geschnitten, CIP-dephosphoryliert) durch vergleichende Analyse mit einem Mengen-geeichten DNA-Standard (pegGold Range Mix, pegLab). **(B)** Etablierung von Erst- und Zweitligation mit dem *polr2a*-Fragment als Insert. Erfolgreiche Erstligation (VI linear; 3,5 kb) nach 6-stündiger Ligation in Gegenwart von *Sal*I bei ausbalanciertem V:I-Verhältnis (Spur 2). Spuren 3 und 4 zeigen den drastischen Effekt eines debalancierten V:I-Verhältnisses in Gegenwart und Abwesenheit von *Sal*I durch Bildung unerwünschter  $V_n$ - sowie VI-Polymere bereits nach 2 h bzw. 1,5 h Reaktionszeit. Die erfolgreiche Zweitligation (Zirkularisierung) mit dem zirkulären VI-Produkt bei 4,5 kb zeigt Spur 5. **(C)** Kolonie-PCR an 124 zufällig isolierten rekombinanten Klonen zweier unabhängiger Ligationsexperimente (obere beiden Panel: 93 Klone nach Ligation von *polr2a*-Fragment; unteres Panel: 31 Klone nach Ligation von 3'-cDNA-Tags) zeigt den Erfolg der 3R-Ligation. +: Positivkontrolle (*polr2a*-Fragment enthaltender Vektor), -: Leervektor (amplifizierte Multiple Cloning Site).

Durch Kolonie-PCR zufällig ausgewählter Klone konnte schließlich gezeigt werden, dass nahezu 100 % rekombinante Transformanten (n=124, 1 Leervektor in zwei unabhängigen Gesamtexperimenten) erhalten werden können (Abb. 3.8 C). Die oberen beiden Panel zeigen 93 per Kolonie-PCR amplifizierte *polr2a*-Inserts nach erfolgreicher 3R-Ligation, im unteren Panel sind die von 31 zufällig isolierten rekombinanten Klonen der 3'-cDNA-Tag-

Bibliothek amplifizierten Inserts dargestellt. 100 % dieser Klone enthielten mindestens ein cDNA-Tag definierter Größe im Bereich von 300 bp - 850 bp. Als Negativkontrolle (Leervektor) diente die amplifizierte *Multiple Cloning Site* (MCS) des pBS-Vektors, als Positivkontrolle ein Vektor mit *polr2a*-Insert. Lediglich ein Klon von 31 entsprechend eines Anteils von 3 % enthielt zwei cDNA-Tags (Ab. 3.8 C, unteres Panel, Spur 1).

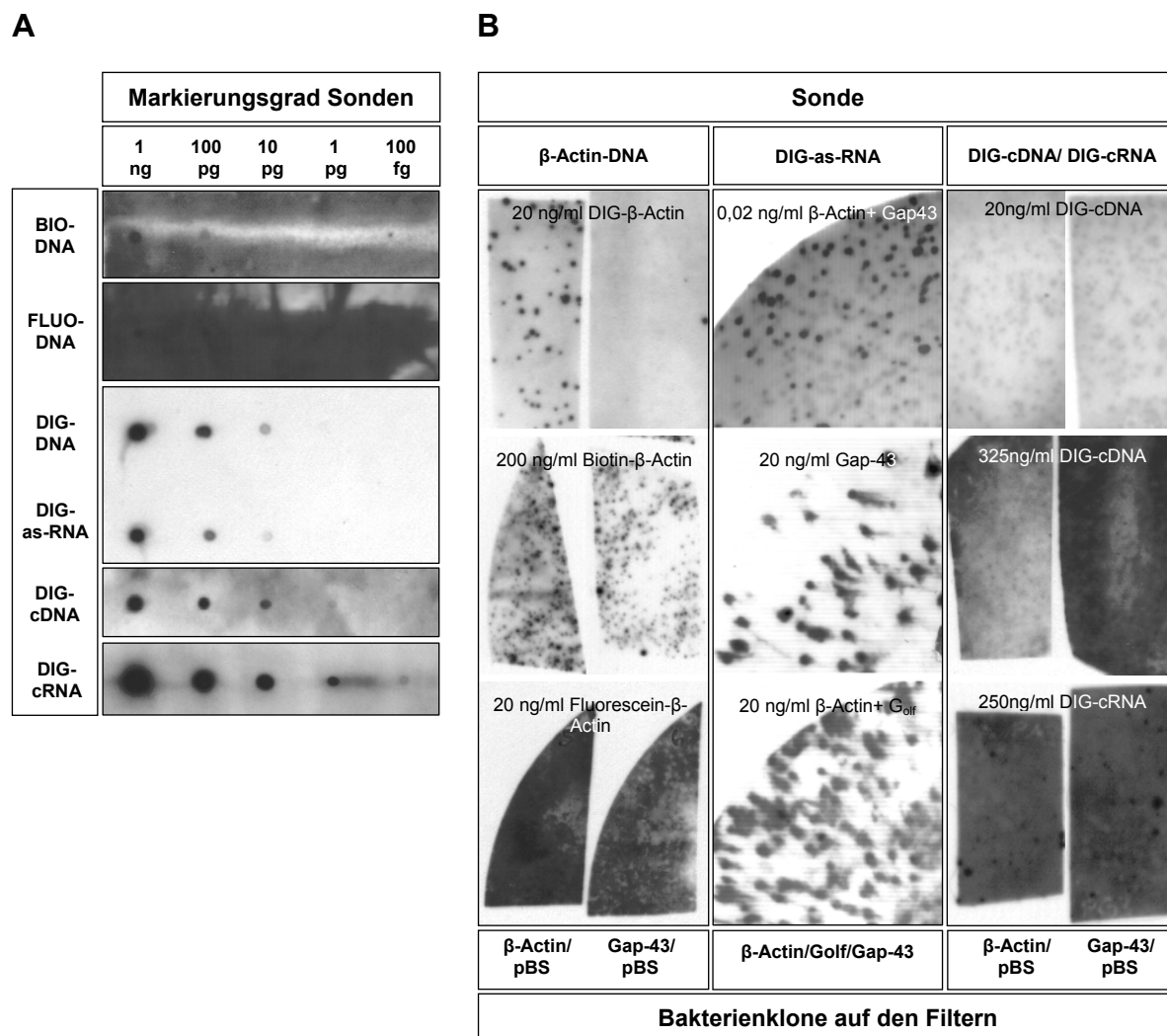
Der relevante Erfolg des neu etablierten 3R-Ligationsverfahrens ist, dass es zirkulär VI weitgehend selektiv und ohne Hintergrund als einziges klonierbares Produkt aus theoretisch unendlich vielen möglichen Produkttypen erzeugt und damit die o.g. Anforderungen an die Klonierung komplexer 3'-cDNA-Tags zweifelsfrei erfüllt.

### **3.1.5 Effiziente Markierung hoch komplexer Sondenpopulationen und Etablierung von nahezu hintergrundfreier Kolonie-Filterhybridisierung**

Die Komplexität einer transkriptomischen cDNA-Sonde sowie die unterschiedlich starke Repräsentation der einzelnen Transkripte erfordern große Mengen einer hochgradig markierten Sonden-Population, die für eine erfolgreiche differenzielle Filterhybridisierung unter relativ unstringenten Hybridisierungsbedingungen starke Signale und möglichst wenig unspezifischen Hintergrund liefert. Quantitativ betrachtet, sollten in der komplexen cDNA-Sonde auch mittel bis schwach exprimierte Transkripte von ~ 10-100 Kopien pro Zelle so stark zur Sonde beitragen, dass ihre Targets in der untersuchten Bibliothek zweifelsfrei identifizierbar sind. Um eine diesen Anforderungen genügende Markierungstechnik zu finden, wurden verschiedene Sonden-Spezies ( $\beta$ -Actin-DNA-Fragment, antisense-RNA-Sonden, cDNA, cRNA) sowohl nicht-radioaktiv (Digoxigenin, Biotin, Fluorescein) als auch radioaktiv mit alpha-<sup>32</sup>P-dATP markiert und ihre Eignung für den Einsatz zum differenziellen Screening geprüft. Hierfür wurden Testfilter mit Kombinationen verschiedener plasmid-transformierter Bakterien mit den entsprechenden Sonden hybridisiert.

Unter den getesteten nicht-radioaktiven Markierungsvarianten, die in Abb. 3.9 dargestellt sind, lieferten mit Digoxigenin (DIG) markierte DNA- sowie -antisense-RNA-Sonden in Bezug auf Signalstärke, Sensitivität und Signal-Rausch-Verhältnis die besten Resultate. Die Markierungsgrade DIG-markierter Sonden lagen dabei um das 10- bis 100-fache über denen von biotin- und fluorescein-markierten DNA-Sonden (Abb. 3.9 A), sodass DIG-markierte Sonden entsprechend geringer konzentriert eingesetzt werden konnten (Abb. 3.9 B). Die Hintergrundproblematik bei Biotin- und Fluorescein-markierten DNA-Sonden mit sehr starker flächiger (Fluorescein) bzw. kolonieartiger (Biotin) Hintergrundbildung nach zum Teil relativ kurzen Expositionszeiten (5 min, Fluorescein-DNA) führte zunächst zur Favorisierung von Digoxigenin als nicht-radioaktives Label. Selbst geringste Mengen DIG-markierter as-RNA-Sonden (0,02 ng/ml), wie man sie von

schwach exprimierten Einzelzell-Transkripten in einer komplexen Sondenpopulation erwarten würde, lieferten eindeutige starke Signale nach Filterhybridisierung und demonstrierten somit deren hohe Sensitivität bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis.



**Abb. 3.9: Nicht-radioaktive Techniken zur Markierung verschiedener Sonden-Spezies für die Kolonie-Filterhybridisierung. (A)** Dot-Blot-Verdünnungsreihen zur Bestimmung des Markierungsgrades verschieden markierter DNA- bzw. RNA-Spezies (DNA: β-Actin-DNA-Fragment, as-RNA: β-Actin antisense-RNA-Sonde, cDNA: aus Gesamt-RNA nach Einzelzell-Protokoll amplifizierte cDNA, cRNA: IVT von T7-cDNA mit T7-antisense-Primer als Sonden für die nicht-radioaktive Kolonie-Filterhybridisierung. Markiert wurde mit Digoxigenin (DIG), Biotin (BIO) bzw. Fluorescein (FLUO). **(B)** Vergleich von β-Actin-DNA nach Markierung mit Digoxigenin, Biotin bzw. Fluorescein (links), von DIG-markierter β-Actin-antisense-RNA (Mitte) sowie DIG-markierter cDNA und cRNA (rechts) hinsichtlich Sensitivität und Signal-Rausch-Verhältnis nach Kolonie-Filterhybridisierung. Konzentrationsangaben pro Sonde, pBS: pBluescript-Leervektor zur Beurteilung der Hintergrundbildung durch falsch Positive. Belichtungszeiten von 20-30 min (Ausnahme: Fluorescein-β-Actin 5 min).

Problematisch erwies sich jedoch die Zuordnung schwacher Signale zu entweder schwach markierten positiven oder falsch positiven Klonen, die beispielsweise nur pBluescript-Vektor und kein Insert enthielten (siehe Abb. 3.9 B, Mitte oben). Dieses Problem konnte auch durch Variation der Hybridisierungslösung (Standard-Puffer, Church-Gilbert-Puffer, DIG Easy Hyb etc.), Verwendung verschiedener Membrantypen (positiv/ negativ geladene,

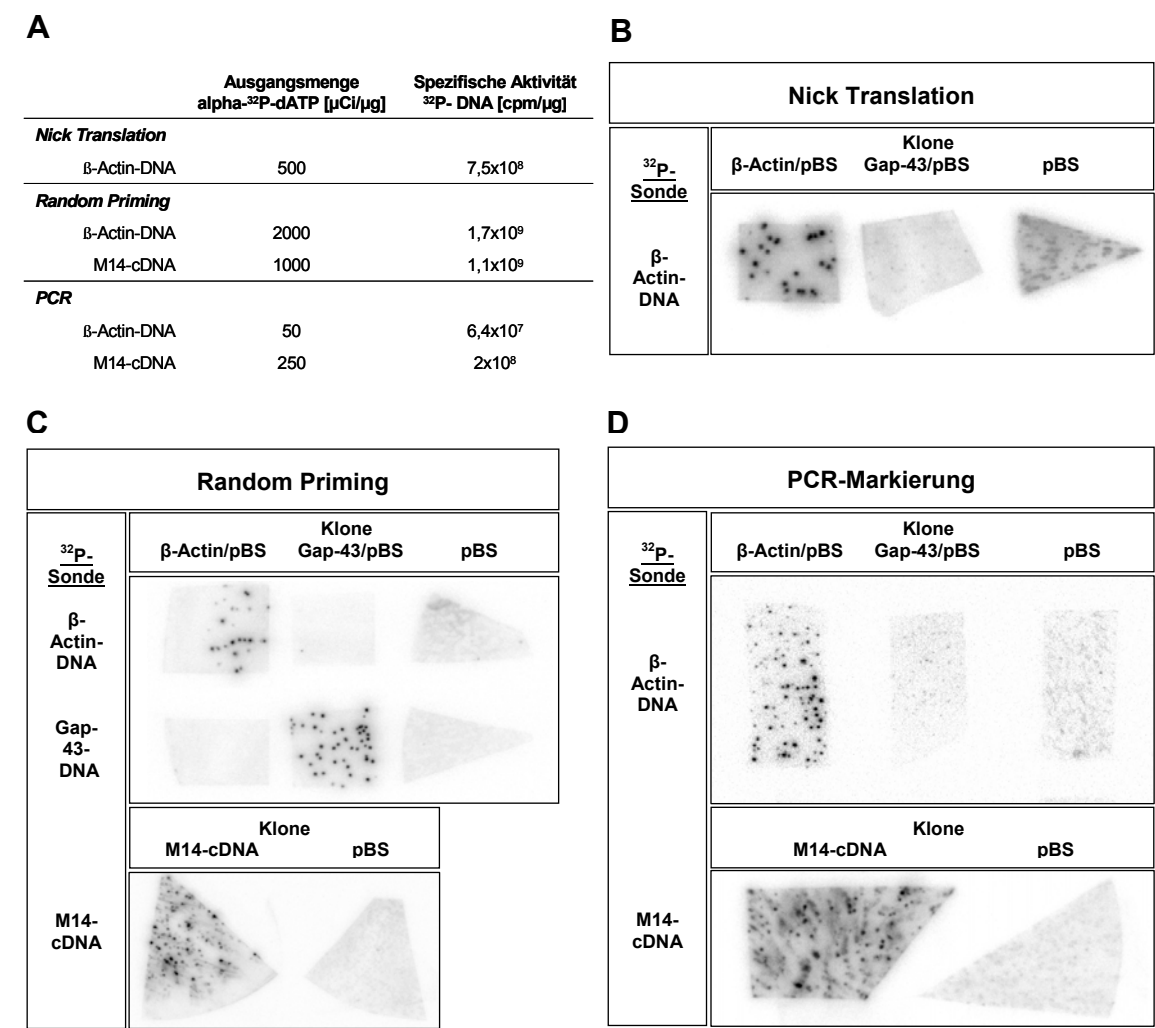


neutrale Nylonmembranen) sowie durch Einsatz blockierender Nukleinsäuren (genomische *E.coli*-DNA, poly-Adenylsäure) nicht behoben werden (Daten nicht gezeigt). Die nicht-radioaktive Kolonie-Filterhybridisierung kam somit für das differenzielle Screening der Einzelzell-cDNA-Bibliothek nicht in Frage.

Alternativ dazu wurden drei radioaktive Markierungsverfahren getestet, die auf dem Einbau radioisotop-substituierter Nukleotide in die zu markierende DNA beruhen: Nick Translation (NT), Random Priming (RP) und PCR (Abb. 3.10). Aufgrund AU-reicher 3'-Bereiche in der ursprünglichen Einzelzell-mRNA weist die davon hergestellte cDNA-Tag-Population einen hohen AT-Gehalt auf und konnte somit durch Verwendung von alpha-<sup>32</sup>P-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham) als Radionukleotid besonders effizient markiert werden. Die Qualität der Sonden wurde zum einen anhand ihrer spezifischen Aktivität ([cpm/μg], Abb. 3.10 A) und zum anderen nach Kolonie-Filterhybridisierung in Bezug auf Spezifität, Sensitivität und Signal-Rausch-Verhältnis beurteilt (Abb. 3.10 B-C).

Mit den beiden kommerziell erhältlichen Systemen für Nick Translation und Random Priming wurden unter Verwendung des jeweiligen Standardprotokolls zum Teil deutlich höhere Markierungsgrade von bis zu  $1,7 \times 10^9$  cpm/μg DNA-Sonde im Vergleich zur PCR-Markierung erreicht. Je nach eingesetzter <sup>32</sup>P-dATP-Menge (μCi/μg DNA) variierte die spezifische Aktivität PCR-markierter DNA-Sonden von  $0,5 - 2 \times 10^8$  cpm/μg DNA (Abb. 3.10 A). Dabei sind Sonden mit spezifischen Aktivitäten  $>10^8$  cpm/μg DNA bereits hochgradig markiert und im Falle von komplexen Sonden-Populationen ausreichend für die Hybridisierung von cDNA-Bibliotheken, wenn Sondenkonzentrationen  $>10^7$  cpm/ml erreicht werden. Betrachtet man zudem den immensen Bedarf an <sup>32</sup>P-dATP/μg DNA sowohl für das Random Priming als auch für die Nick Translation, so scheinen diese beiden Methoden zur Generierung mehrerer Mikrogramm <sup>32</sup>P-markierter cDNA-Sonde eher ungeeignet. Auch die sequenzunabhängige Markierung beider Methoden birgt Risiken für die spätere Hybridisierung der cDNA-Bibliothek. Die Vorteile der PCR-Markierungstechnik sind neben ihrer Sequenzspezifität durch Verwendung von Primern (genspezifisch, SR-T<sub>24</sub>) und dem geringen Radionukleotidbedarf eine durch Amplifikation der eingesetzten DNA erzielbare höhere Ausbeute an <sup>32</sup>P-markierter Sonden-DNA. Um einen optimalen Markierungsgrad der cDNA bei gleichzeitiger Amplifikation gewährleisten zu können, musste zuvor ein ausbalanciertes Verhältnis von radioaktivem zu nicht-radioaktivem dATP eingestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ein 10-facher Überschuss von dATP (10 μM) zu <sup>32</sup>P-dATP (0,99 μM = 250 μCi) resultierte in einer Verdreifachung der eingesetzten cDNA-Menge in 10 PCR-Zyklen, so dass bei Einsatz von 250 μCi <sup>32</sup>P-dATP/μg cDNA ca. 2 μg <sup>32</sup>P-cDNA mit einer spezifischen Aktivität von  $2 \times 10^8$  cpm/μg DNA neu synthetisiert werden konnten (Abb. 3.10 A). Inwieweit das PCR-Verfahren den beiden anderen Methoden für den

vorliegenden Zweck tatsächlich vorzuziehen war, sollte schließlich die Hybridisierung von Kolonie-Filtern klären (Abb. 3.10 B-D).



**Abb. 3.10: Radioaktive Markierung von Sonden für die Kolonie-Filterhybridisierung. (A)** Spezifische Aktivitäten von DNA-Sonden nach Markierung mit alpha-<sup>32</sup>P-dATP. M14-cDNA: amplifizierte Einzelzell-cDNA eines reifen OSN. **(B-D)** Vergleich der durch **(B)** Nick Translation, **(C)** Random Priming bzw. **(D)** PCR markierten <sup>32</sup>P-DNA-Sonden nach Kolonie-Filterhybridisierung hinsichtlich Sensitivität und Signal-Rausch-Verhältnis. pBluescript-Vektor (pBS) enthaltende Bakterienfilter dienten als Negativkontrolle zur Beurteilung des Hintergrundsignals durch unspezifische Sondenbindung.

Die als Positivkontrollen dienenden radioaktiv markierten β-Actin- bzw. Gap-43-DNA-Sonden zeigten für alle drei Markierungsverfahren starke und vor allem spezifische Signale auf den korrespondierenden Koloniefiltern. Das dabei auftretende Hintergrundproblem bei NT-markierter β-Actin-DNA beruhte auf sehr effizient markierten Spuren-Mengen des Vektors, von dem das β-Actin-Fragment ursprünglich hergestellt wurde und war somit zu vernachlässigen (Abb. 3.10 B, oben). Dieses Problem konnte gelöst werden, indem durch RT-PCR generierte β-Actin- bzw. Gap-43-DNA verwendet wurde, die den Vektor natürlich nicht mehr enthält. Schließlich wurde eine auf Koloniefiltern plattierte Einzelzell-cDNA-Bibliothek (M14-cDNA) mit komplexen, über Random Priming bzw. PCR markierten M14-cDNA-Sonden hybridisiert (Abb. 3.10 B+C, unten). Trotz ihrer deutlich höheren

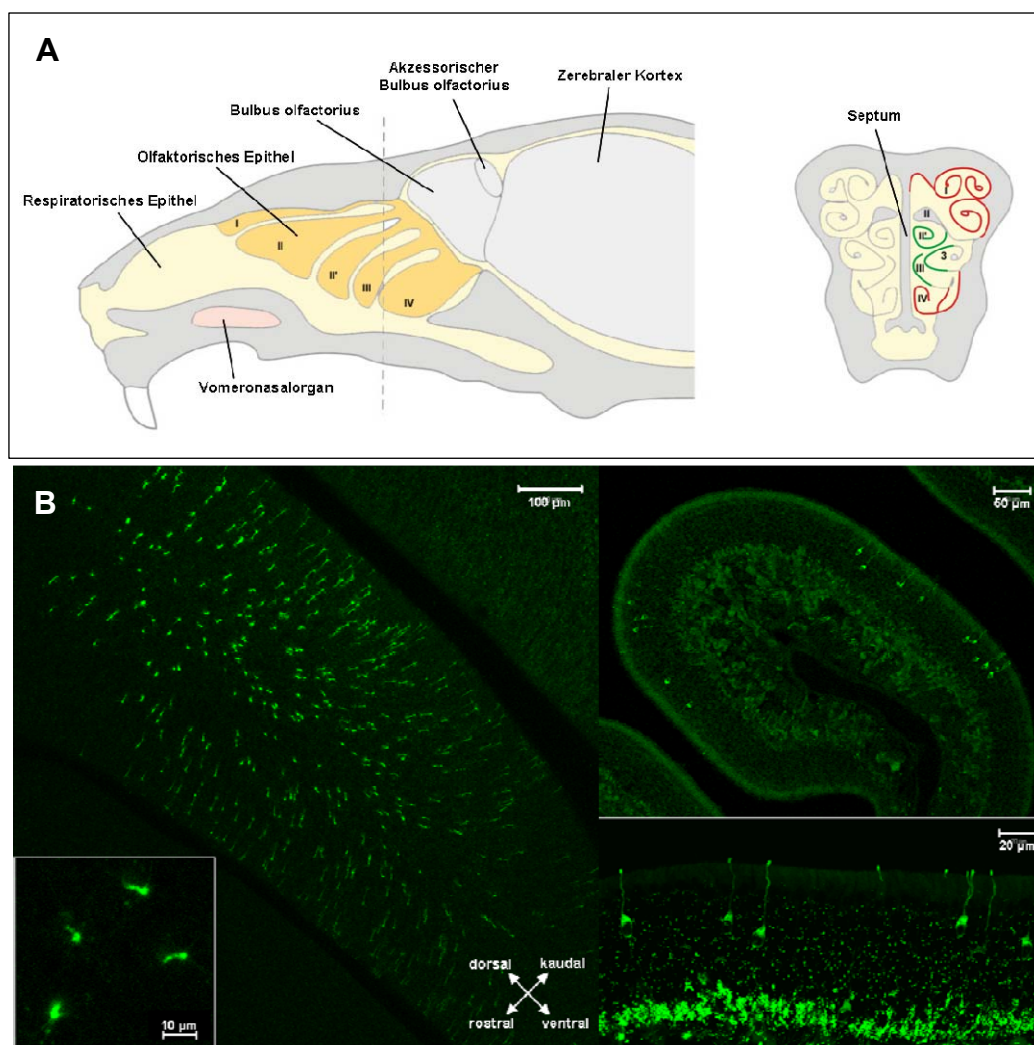
---

spezifischen Aktivität von  $1,1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA lieferte die RP-markierte M14-cDNA-Sonde im Vergleich zur PCR-markierten M14-cDNA-Sonde ( $2 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g) ein schwächeres Signal bei gleichen Expositionszeiten. Letztlich konnte durch PCR bei moderatem Radionukleotid-Einsatz (250  $\mu$ Ci/ $\mu$ g DNA) eine effiziente Sondenmarkierung kombiniert mit einem starken, nahezu hintergrundfreien Hybridisierungssignal erreicht werden. Die PCR-Markierung erwies sich damit als die optimale, den Anforderungen entsprechende Markierungstechnik für das differenzielle Screening von Einzelzell-cDNA-Bibliotheken.

## 3.2 Biologische Ergebnisse

### 3.2.1 3'-cDNA-Tags individueller olfaktorischer Neuronen als Ausgangsmaterial für das Screening einer mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen-Bibliothek

Im posterodorsalen Teil der Nasenhöhle befindet sich das Riechepithel von Säugern, welches auf knöchernen Ausstülpungen der Nasenhöhlenwand, den Turbinalien, aufliegt. Im Gegensatz zur Mehrzahl der Geruchsrezeptoren, die zonal beschränkt, aber über viele Turbinalien hinweg exprimiert sind, findet man die Rezeptoren der mOR37-Subfamilie in einem eng definierten zentralen Bereich, der die Endoturbinalien II' und III sowie Ektoturbinalie 3 umfasst (Abb. 3.11 A, grüne Markierung).



**Abb. 3.11: Phänotyp der verwendeten mOR37B-EGFP-transgenen Mauslinie.** Allgemeine schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse im murinen Geruchssystem (A) mit Verdeutlichung der für den jeweiligen Zelltyp präparierten Regionen des Riechepithels (grün: mOR37B-Rezeptorneuronen enthaltend; rot: Nicht-OR37-Rezeptoren enthaltend) (modifiziert nach Dulac und Torello (2003)). (B) Endoturbinalie II' mit mOR37B-EGFP-exprimierenden Riechsinneszellen *in situ*. Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer unfixierten whole mount-Präparation der Nase (linkes Bild mit Vergrößerung, mediale Aufsicht; Maßstab: 100 µm, Ausschnitt 10 µm) sowie von PFA-fixiertem Gewebe im Querschnitt (rechte Teilbilder; Maßstab oben: 50 µm, Maßstab unten: 10 µm). Die starke EGFP-Fluoreszenz im unteren rechten Teilbild entspricht angeschnittenen mOR37B-Axonon, die als Faszikel unterhalb des OE zum OB projizieren.

Die anatomischen Verhältnisse *in situ* zeigt Abb. 3.11 B. Riechepithel aus diesem Gebiet diente der Gewinnung von reifen (Zelltyp M) und unreifen (Zelltyp I) *mOR37B-EGFP*-positiven Neuronen, wohingegen für die Isolierung unreifer Neuronen einer beliebigen anderen Rezeptorspezifität (Zelltyp X) dieser Bereich strikt vermieden und Gewebe aus mehr rostrorodorsal und kaudoverdorsal dazu gelegenem Riechepithel verwendet wurde (Abb. 3.11 A, rote Markierung).

Die Schwierigkeit bei Einzelzell-Transkriptomanalysen beginnt bereits mit der Isolierung der einzelnen Zelle aus einer heterogenen Zellpopulation in Suspension, die so kontaminationsfrei wie möglich erfolgen muss. Aus abgestorbenen Zellen freigesetzte Fragmente genomischer DNA, mRNA sowie RNasen können die anschließende Synthese und Amplifikation von Einzelzell-cDNA negativ beeinflussen und das Einzelzell-Transkriptom verfälschen. Aus diesem Grund wurde strikt auf die Reinheit der parallel mitgeführten Negativkontrollen geachtet. Für die Negativkontrollen wurden in eine frische Kapillare zunächst wenige Mikroliter Zellsuspension eingesaugt und nach 3-maligem Ausspülen in jeweils frischem Puffer (HBSS/1 % FCS) ca. 0,5 µl des letzten Wasch-Puffers in ein Reaktionsgefäß mit Lysepuffer überführt und analog zu den isolierten OSNs prozessiert. In keiner der Negativkontrollen waren im Southern Blot genspezifische Transkripte nachweisbar, sodass von einer kontaminationsfreien Einzelzell-cDNA-Amplifikation ausgegangen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

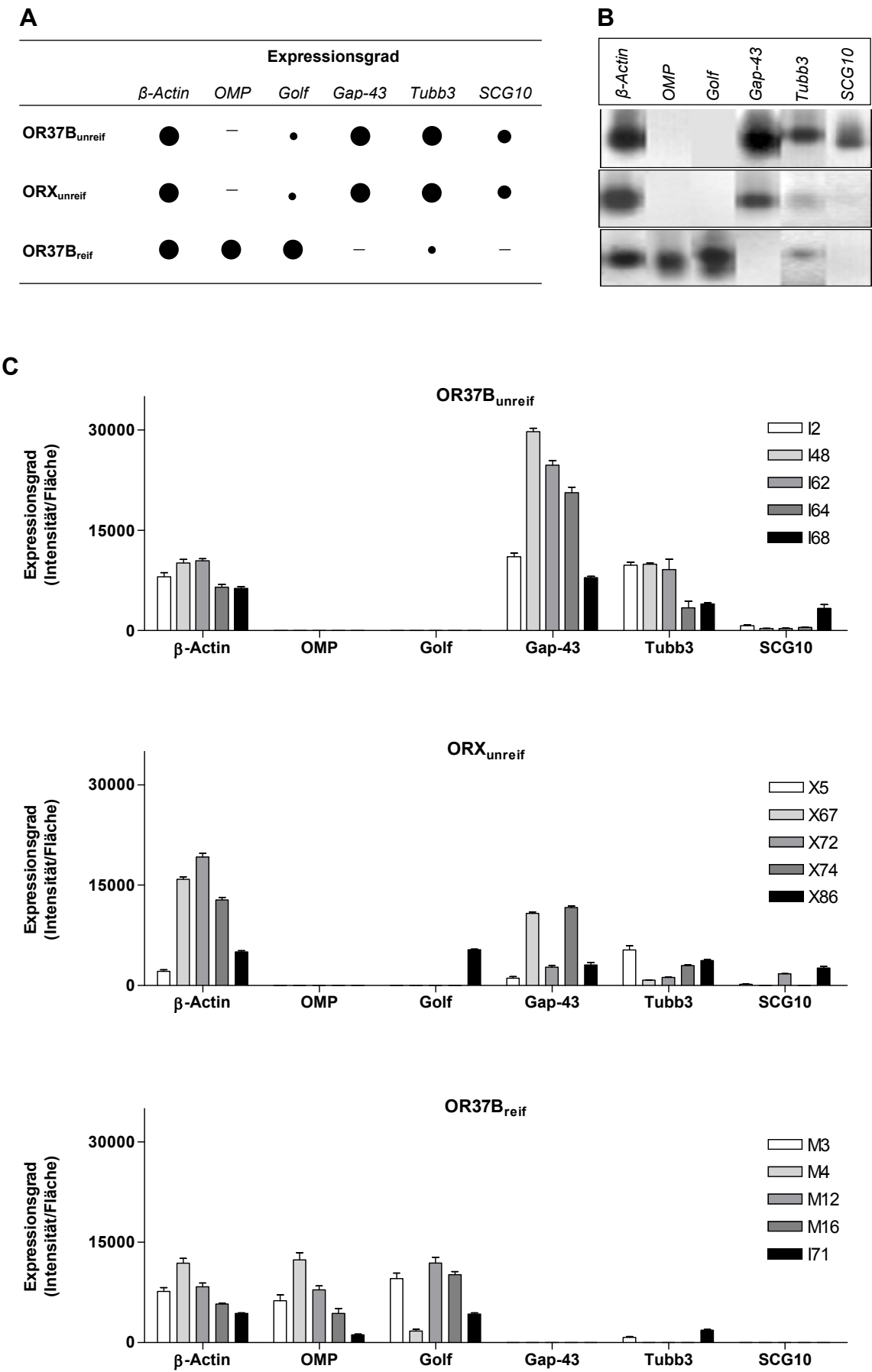
Auf diese Weise wurden systematisch insgesamt 184 individuelle Riechsinneszellen isoliert. Schon bei der Isolierung sind *mOR37B<sub>reif</sub>*- und *mOR37B<sub>unreif</sub>*- Zellen durch ihre EGFP-Expression erkennbar. Die daraus amplifizierten Einzelzell-cDNAs wurden zur Verifizierung des jeweiligen Zelltyps (*mOR37B<sub>reif</sub>*, *mOR37B<sub>unreif</sub>* bzw. *ORX<sub>unreif</sub>*) im Southern-Blot auf eine zelltypspezifische Kombination von Genen hin untersucht. Sechs verschiedene Gene wurden analysiert: das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin für Aussagen über die zelluläre Integrität, OMP als Marker für reife OSNs, *G<sub>olf</sub>* als Bestandteil der Signaltransduktionskaskade reifer OSNs, Gap-43 und SCG10 als neuronale Unreifemarker sowie Tubb3 als Marker vorwiegend unreifer OSNs. Tubb3 war dabei neben Gap-43 von besonderer Bedeutung für die zweifelsfreie Identifikation der ORX-Population von OSNs, da diese Zellen basierend auf dem Negativ-Selektionskriterium „EGFP-negativ“ isoliert wurden. Reife, *mOR37B-EGFP+* Riechsinneszellen (Zelltyp M) sollten demnach eine mittlere bis starke Expression von  $\beta$ -Actin, OMP und *G<sub>olf</sub>* aufweisen, negativ bis schwach-positiv für Tubb3 sowie negativ für Gap-43 und SCG10 sein. Marker für unreife Neuronen (Zelltyp I: *mOR37B-EGFP+*; Zelltyp X: *ORX+*, *EGFP-*) sollten eine mittlere bis starke Expression von  $\beta$ -Actin, Gap-43 und Tubb3, eine moderate Expression von SCG10 sowie das Fehlen von OMP und *G<sub>olf</sub>* sein (Abb. 3.12 A+B).

Nach Anlegen strenger Auswahlkriterien konnten jeweils fünf Zellen mit paradigmatischem genetischen Fingerabdruck für jeden Zelltyp gewonnen werden, deren cDNAs nach Zelltyp gepoolt, als Ausgangsmaterial für die Herstellung der cDNA-Bibliothek (mOR37B<sub>unreif</sub>) sowie für die zu markierenden hochkomplexen Sondenpopulationen dienten.

Die Expressions-Codes aller, für den I-, M- und X-cDNA-Pool verwendeten Einzelzell-cDNAs sind in Abb. 3.12 C zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW  $\pm$  SEM, n=8) der absoluten Signalintensitäten (Grauwert/Fläche auf Densitogrammen von Southern-Blot-Chemiluminographien) für jedes der sechs Gene als Maß für dessen Expressionsgrad in jeder Einzelzell-cDNA. Die Expressionsprofile aller verwendeten Einzelzell-cDNAs entsprechen klar den geforderten Kriterien für jeden der drei Zelltypen I, X und M.

---

**Abb. 3.12: Individuelle Expressionsprofile der verwendeten OSNs ermöglichen eine zweifelsfreie Charakterisierung ihres Zelltyps.** (A) Zusammenfassung der nach Southern-Analyse in den amplifizierten Einzelzell-cDNAs jeweils zu erwartenden Expressionsstärken für die Marker-Gene  *$\beta$ -Actin*, *OMP*, *Golf*, *Gap-43*, *Tubb3* und *SCG10* mit (B) je einem repräsentativem Beispiel (Southern-Blot) für den I-, X- und M-Zelltyp. (C) Expressionsprofile aller verwendeten OSNs (fünf pro Zelltyp). Zur Generierung der nötigen cDNA-Menge für Klonierung und differenzielles Screening wurden je 8 parallele PCR2-Ansätze/Einzelzell-cDNA prozessiert, im Southern-Blot analysiert und densitometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die gemittelten absoluten Signalintensitäten/Fläche (MW  $\pm$  SEM; n=8). Die individuellen Zellen sind mit I, X, M und einer Ziffer benannt.



### 3.2.2 Die 3'-cDNA-Tag-Bibliothek

Mit dem eigens für die Herstellung der Einzelzell-cDNA-Bibliothek entwickelten neuen Klonierungsverfahren konnte eine Bibliothek mit einer Gesamtgröße von  $6,5 \times 10^6$  rekombinanten Kolonien/ $\mu\text{g}$  DNA generiert werden. Die für eine angestrebte Zahl von Kolonien erforderliche Menge an Ligationsprodukt musste in Vorversuchen bestimmt werden, denn letzteres enthält an transformierbaren Konstrukten zwar praktisch nur die gewünschten rekombinanten Plasmide mit genau einem Insert, darüber hinaus aber einen Überschuss an nicht-transformierbaren DNAs. Die durchschnittliche, aus einer Stichprobe von 192 sequenzierten *Tags* ermittelte Insert-Größe lag bei  $246 \pm 106$  bp, maximal 3% davon enthalten Artefakte wie Primer-Dimere oder Doppel-Inserts (siehe 3.1.4, Kolonie-PCR). Im Vorfeld ist des Weiteren zu klären, welche Anzahl an Klonen sinnvollerweise gescreent werden sollte, um Gene einer bestimmten Häufigkeit im Transkriptom einer einzelnen Zelle detektieren zu können. Mögliche mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierte Differenzierungsmoleküle sollten zu einem Zeitpunkt, an dem die unreife mOR37B-Riechsinneszelle hauptsächlich mit diesem Prozess (z.B. dem Auswachsen ihres Axons und der Wegfindung zum *Bulbus olfactorius*) „beschäftigt“ ist, in deutlich erhöhten Kopienzahlen in der Zelle vorliegen. Unter der Annahme, dass eine Anzahl  $N$  von  $\sim 500.000$  mRNA-Molekülen pro OSN exprimiert ist, und man mit einer Detektionswahrscheinlichkeit  $P$  von 95 % wenigstens mittelstark exprimierte Transkripte mit einer Kopienzahl  $n$  von  $\sim 100$  Molekülen/Zelle analysieren möchte, so ergibt sich die Zahl der zu screenenden Kolonien nach folgender Gleichung:

$$\begin{aligned} \text{Kolonienzahl} &= \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1-\frac{n}{N}\right)} \\ &= 1497 \end{aligned} \quad \begin{array}{l} N=500.000 \\ n=100 \\ P=0,95 \end{array}$$

Mindestens 15.000 Kolonien müssten demnach gescreent werden. Aus logistischen Gründen konnten aber 6 Kolonie-Filter mit jeweils  $\sim 4500$  Kolonien/Filter parallel prozessiert werden, sodass letztendlich eine  $\sim 27.000$  Klone umfassende 3'-cDNA-Tag-Bibliothek analysiert wurde. Bei einer Filterfläche von  $A=137 \text{ cm}^2$  betrug die Koloniedichte im ersten Screening, dem Hauptscreen, durchschnittlich  $33 \text{ Kolonien/cm}^2$ . Die Koloniefilter wurden jeweils in gleicher Reihenfolge zuerst mit  $^{32}\text{P}$ -markierter M-Pool-cDNA, anschließend mit  $^{32}\text{P}$ -markierter X-Pool-cDNA sowie zuletzt mit  $^{32}\text{P}$ -cDNA des I-Pools hybridisiert. Nach Detektion des jeweiligen Signals wurde die an den Koloniefiltern gebundene Sonde vor jeder weiteren Hybridisierung durch Strippen vollständig entfernt. Die Vollständigkeit des



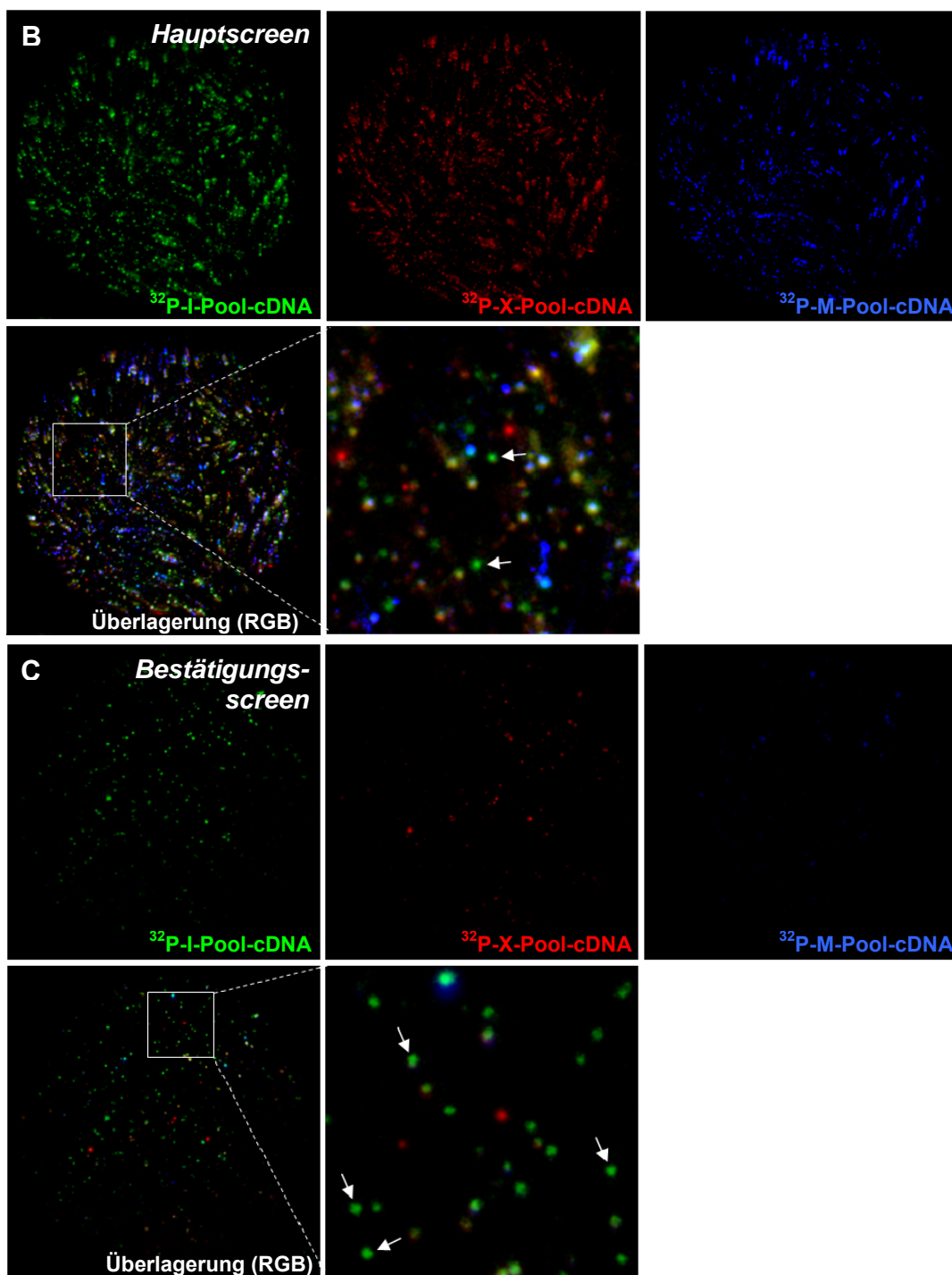
Stripping wurde jeweils durch eine Zwischenexposition sichergestellt. Spezifische Aktivitäten (cpm/ $\mu$ g) sowie die finalen Sondenkonzentrationen in der Hybridisierungslösung (cpm/ml) der einzelnen für Haupt- und Bestätigungsscreen verwendeten cDNA-Sondenpopulationen sind in Abb. 3.13 A zusammengefasst. Im Vergleich zu den für die Protokoll-Etablierung durchgeführten Experimenten (Abb. 3.10 A, M14-cDNA; PCR) waren die spezifischen Aktivitäten und damit die resultierenden Endkonzentrationen der cDNA-Sonden zwar etwas geringer, bei den erreichten, sehr guten Signalintensitäten war dieser Aspekt jedoch zu vernachlässigen. Die mittels Phosphor-Imaging ausgelesenen Signale wurden in RGB-Falschfarben dargestellt und nach Überlagerung hinsichtlich mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischer Kolonien, die grün kodiert waren, ausgewertet (Image J, Version 1.38, NIH, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

In Abb.13 B sind die Ergebnisse des Hauptscreenings der mOR37B<sub>unreif</sub>-cDNA-Bibliothek exemplarisch für einen Filter dargestellt. Man sieht deutlich, dass jede der drei Sondenpopulationen eine annähernd gleichgroße Anzahl an Kolonien markiert. Die Positivkontrollsonde mOR37B<sub>unreif</sub> sollte theoretisch alle, die beiden differenziellen Sonden je nur Teilmengen der plattierten Klone markieren. Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen Sondenpopulationen könnten ursächlich dafür sein. Möglicherweise existieren zwischen den als Sonden markierten Einzelzell-Transkriptomen quantitativ auch geringere Unterschiede als erwartet. Nach Überlagerung der drei Signale sind neben rein grünen Kolonien (mOR37B<sub>unreif</sub>, siehe Pfeilmarkierung) hauptsächlich Mischfarben vorhanden. Bemerkenswerterweise findet man aber auch rein rote (ORX<sub>unreif</sub>) und rein blaue (mOR37B<sub>reif</sub>) Kolonien, die eigentlich in den ausplattierten mOR37B<sub>unreif</sub>-Klonen nicht vorkommen dürften und somit Artefakte darstellen. Insgesamt 384 eindeutig nur durch die I-Pool-cDNA-Sonde und keine der beiden anderen Sonden markierte Klone wurden zur Bestätigung in einem zweiten Screening bei deutlich geringerer Koloniedichte (5 Kolonien/cm<sup>2</sup>) nachgescreent. Der Erfolg der Selektion grüner, mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischer Klone ist eindeutig an der starken Anreicherung grüner, mit der I-Pool-cDNA markierter Kolonien auf dem Filter in Abb.3.13 C zu erkennen. Aufgrund der geringen Koloniedichte waren die wenigen roten, blauen oder gemischtfarbigen Klone klar von den selektierten grünen Klonen separiert, so dass mit dem zweiten Screening der cDNA-Bibliothek insgesamt 192 mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifische Klone zweifelsfrei identifiziert, isoliert und sequenziert werden konnten.

**Abb.3.13: Radioaktives Screening der mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen 3'-cDNA-Tag-Bibliothek liefert eindeutig differenziell exprimierte Klone.** (A) Zusammenfassung von Markierungsgraden (cpm/ $\mu$ g) und eingesetzter Endkonzentrationen (cpm/ml) der verwendeten <sup>32</sup>P-cDNA-Sondenpopulationen im Haupt- und Bestätigungsscreen. Signale der mit I-, X- und M-Pool-cDNA-Sonden markierten Kolonien des (B) Hauptscreens sowie (C) des Bestätigungsscreens nach Phosphor-Imaging und RGB-Falschfarben-Kodierung (obere Bildreihe). Die Überlagerung der drei Kanäle (untere Bildreihe) zeigt sowohl differenzielle (grüne) (Pfeilmarkierungen in B) als auch nicht-differenzielle (alle Mischfarben) und „artifizielle“ Klone (rein rot/blau) sowie den gewünschten Effekt der Selektion mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischer, grün dargestellter Kolonien im Bestätigungsscreening (untere Reihe in C).

**A**

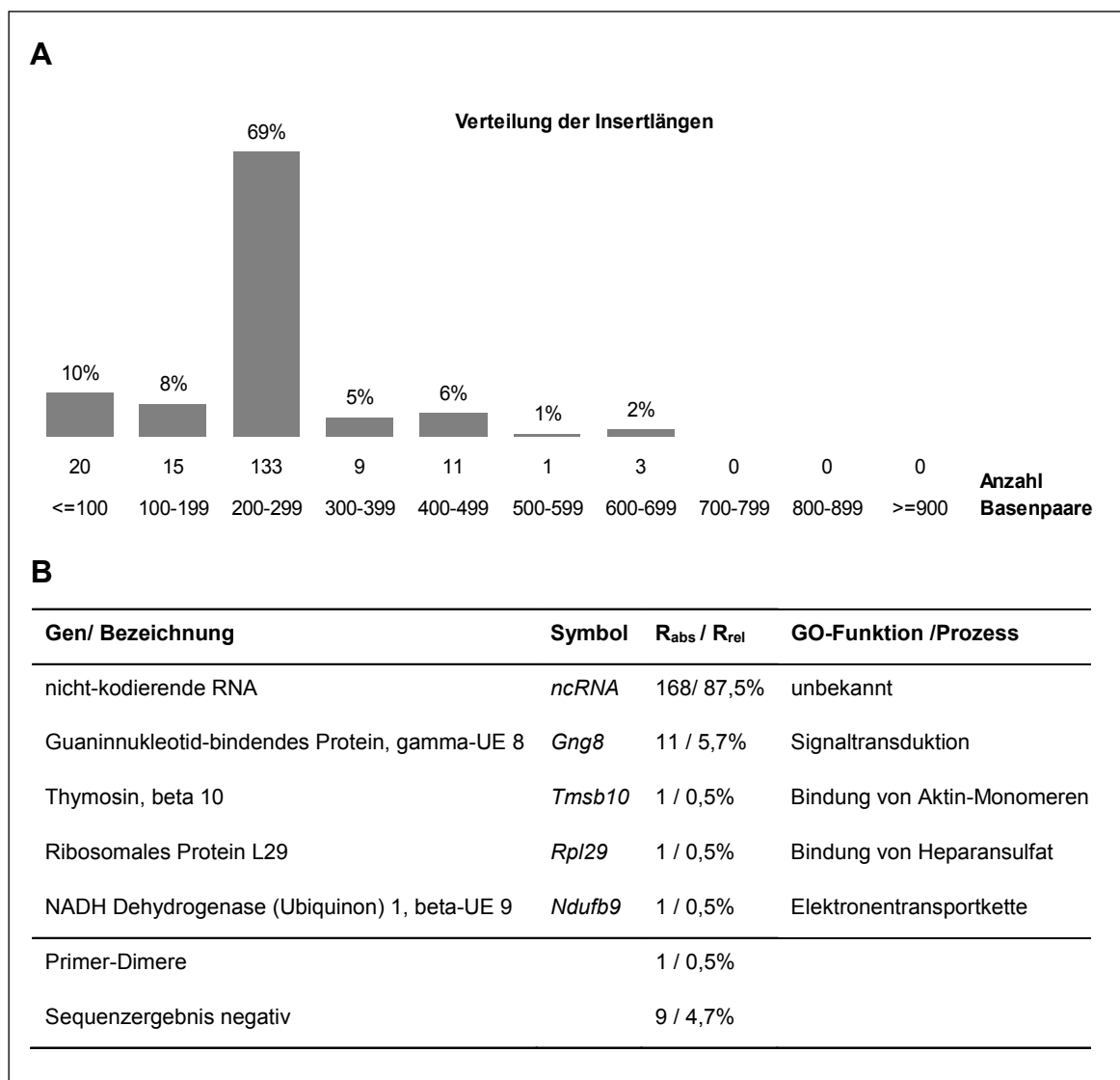
	Spezifische Aktivität $^{32}\text{P}$ -cDNA [cpm/ $\mu\text{g}$ ]	Sondenkonzentration Hybridisierung [cpm/ml]
<b>Hauptscreen</b>		
I-Pool-cDNA	$5,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
M-Pool-cDNA	$6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
X-Pool-cDNA	$7,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
<b>Bestätigungsscreen</b>		
I-Pool-cDNA	$4,3 \times 10^7$	$0,9 \times 10^7$
M-Pool-cDNA	$8,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
X-Pool-cDNA	$6,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$



### 3.2.3 Sequenzen und Repräsentation mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifisch exprimierter Gene

Zur Identifizierung der nach zweimaligem Screening isolierten, differenziellen Klone erfolgte deren Sequenzierung unter Verwendung eines Primers gegen den T3-Promotor des Vektors, der ca. 40 Nukleotide von der Insertionsstelle entfernt ist (s. Tab. 1, Anhang III). Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Abb. 3.12 zusammengefasst. Betrachtet man diese zunächst einmal quantitativ (Abb. 3.14 A), so wiesen 91 % der Sequenzreads Längen von 100-800 bp auf, die ausreichend für eine Sequenzidentifizierung sind. Lediglich 9 % der Sequenzen waren kürzer als 100 bp. Sequenzierungs-Abbrüche und/oder eine fehlerhafte automatische Sequenz-Auslesung, vielleicht bedingt durch die vom SR-T<sub>24</sub>-Primer stammenden, die Insertsequenz flankierenden poly(T)- bzw. poly(A)-Bereiche, sind als mögliche Ursachen dafür anzuführen. Mit 100-700 bp lag der Großteil der cDNA-Inserts (91 %) im erwarteten Bereich. Einige kürzere Sequenzen (100-200 bp) resultierten hierbei von dem vor der Klonierung durchgeführten *Xho*-I-Verdau der längen-limitierten I-Pool-cDNA, deren durchschnittliche Länge sich dadurch natürlich leicht reduzierte. Sequenzen bereits bekannter Gene lagen erwartungsgemäß im 3'-UTR-Bereich der mRNA-Sequenz. Qualitativ betrachtet führte das differenzielle Screening der mOR37B<sub>unreif</sub>-cDNA-Bibliothek zur Identifizierung von fünf differenziell exprimierten Transkripten, darunter eines mit bisher unbekannter Funktion, jedoch entgegen möglicher Erwartungen nicht zu Lenkungsmolekülen *per se*. Die Tabelle in Abb. 3.14 B zeigt eine Auflistung aller 192 analysierten cDNA-Klone mit ihrer Identität (Bezeichnung/Gen), ihrer absoluten sowie prozentualen Häufigkeit ( $R_{abs}$ ,  $R_{rel}$ ) unter den sequenzierten Klonen und soweit bekannt, mit beschriebener Funktion. Insgesamt 168 der 192 Klone (87,5 %) entfielen auf eine RNA-Sequenz unbekannter Funktion (*ncRNA*), 11 Klone (5,7 %) auf die G-Protein gamma-Untereinheit 8 (*Gng8*) und je ein Klon (0,5 %) auf beta-Thymosin 10 (*Tmsb10*), Ribosomales Protein L29 (*Rpl29*) sowie NADH Dehydrogenase 1, beta-Untereinheit 9 (*Ndufb9*). Neben neun Klonen mit negativem Sequenzergebnis (4,7 %) enthielt lediglich ein Klon (0,5 %) eine eindeutig durch Primer-Dimerisierung entstandene Sequenz. Unter den Genen mit bereits beschriebener Funktion befindet sich mit dem *Ndufb9*-Gen ein klassisches Stoffwechselenzym, welches an Elektronentransportprozessen der Atmungskette beteiligt ist [GeneOntology-Datenbank; <http://www.geneontology.org/>]. *Rpl29*, ein stark Heparin bzw. Heparansulfat bindendes, ribosomales Protein, ist nachweislich an der Kontrolle von Zelladhäsion und Zellwachstum beteiligt (Kirn-Safran et al., 2002; Miller et al., 2003; Kirn-Safran et al., 2007; Kirn-Safran et al., 2008), beides Prozesse, die auch bei der Verdrahtung olfaktorischer Sinneszellen eine zentrale Rolle spielen. Für das zur Gruppe kleiner actinmonomer-bindender Peptide gehörende beta-Thymosin 10 ist dagegen eine

Beteiligung an der Zytoskelett-Organisation im sich entwickelnden Zentralnervensystem der Ratte beschrieben, wo es eine starke Expression in späten embryonalen bis früh postnatalen Stadien zeigt (Lugo et al., 1991; Huff et al., 2001). Das mit knapp 6 % zweithäufigste Transkript unter den analysierten differentiellen Klonen, die G-Protein-gamma 8-Untereinheit, ist spezifisch in unreifen Neuronen des Riechepithels sowie des Vomeronasalorgans exprimiert (Ryba und Tirindelli, 1995). Das mit 87,5 % mit Abstand häufigste unter den 192 sequenzierten Transkripten ist eine nicht-kodierende RNA (ncRNA, für: *non-coding*). Erste bioinformatische Analysen der ncRNA-Sequenz (Primärstruktur) lieferten keine erkennbaren Homologien zu Genen bekannter Funktion.



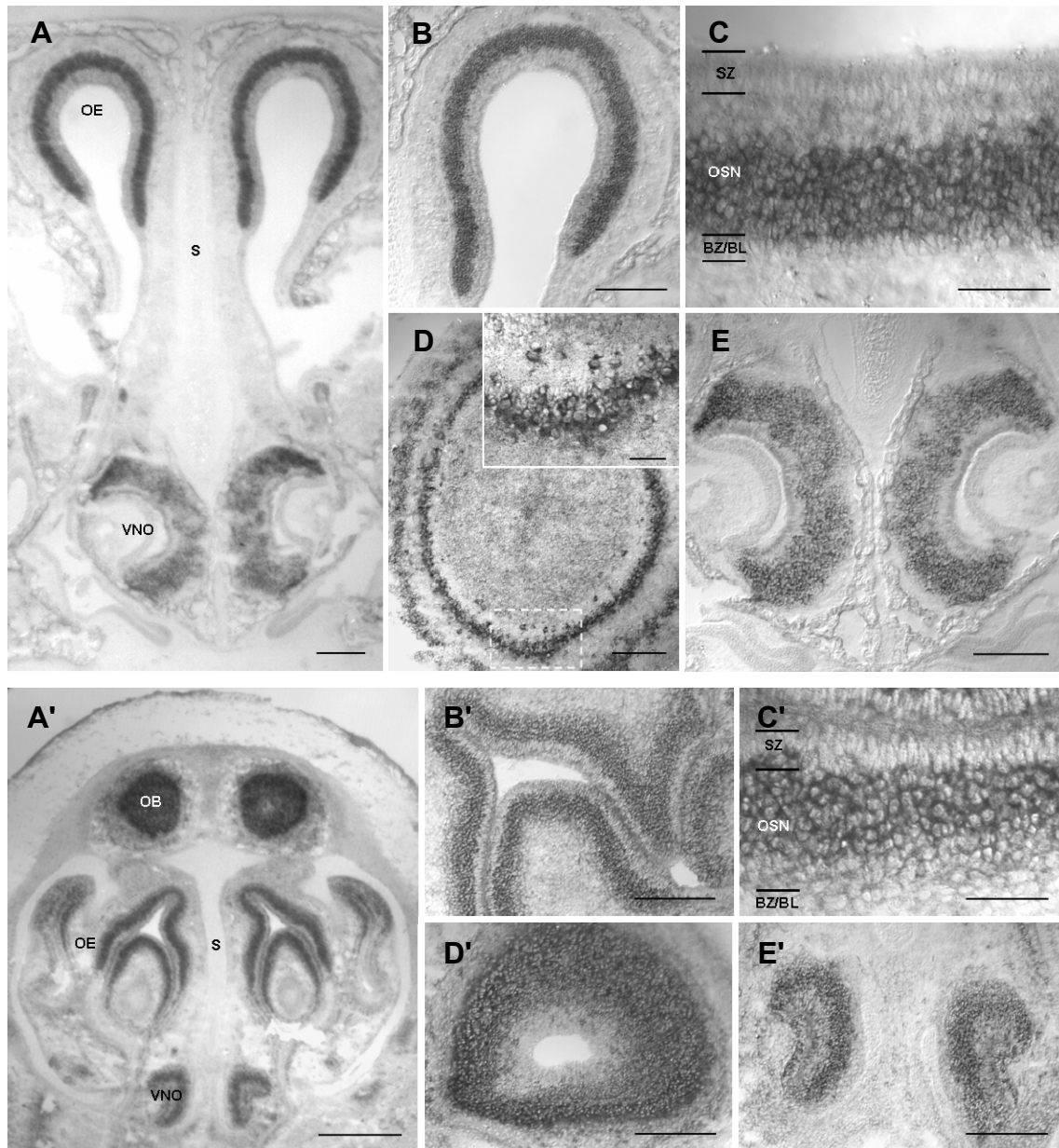
**Abb. 3.14: Sequenzanalyse der differentiell in unreifen mOR37B-OSNs exprimierten Gene. (A)** Häufigkeitsverteilung der Insertlängen (bp) der 192 sequenzierten mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen cDNA-Klone. Sehr kurze (0-100 bp) cDNA-Insertsequenzen sowie negative Sequenzierungsergebnisse beruhen auf Sequenzierungs-Abbrüchen verursacht durch poly(T)- bzw. poly(A)-Bereiche oder fehlerhafter Sequenzidentifizierung durch zu starke Sequenzüberlagerung. **(B)** Bezeichnung, absolute (R<sub>abs</sub>) und relative (R<sub>rel</sub>) Repräsentation unter den sequenzierten Klonen sowie annotierte Funktion (*Gene Ontology*-Datenbank) der fünf differentiell in unreifen mOR37B-OSNs exprimierten Gene. Die Identifizierung der Gene erfolgte mittels BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3.2.4 *In-situ*-Verifizierung ausgewählter mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischer Transkripte im olfaktorischen System mOR37B-EGFP-transgener Mäuse

Die Expressionsmuster von drei der fünf durch differenzielles Screening der Einzelzell-cDNA-Bibliothek als mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifisch identifizierten Transkripte - *Tmsb10*, *Gng8* und *ncRNA* - wurden zur Überprüfung ihrer prognostizierten Zelltypspezifität im Gewebe analysiert. Zu diesem Zweck wurden *in-situ*-Hybridisierungen an koronalen Gefrierschnitten des Kopfes zu den Entwicklungszeitpunkten E16 und P7 durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Geweben des allgemeinen und akzessorischen Geruchssystems: dem Riechepithel, dem *Bulbus olfactorius* und dem Vomeronasalorgan. Es wurden DIG-markierte antisense-RNA-Sonden verwendet, die von neu klonierten, für die *in-situ*-Hybridisierung optimierten Templates abgeleitet waren, aber in jedem Fall die aus dem Einzelzell-Screen resultierenden Sequenzbereiche enthielten. Nur eines der getesteten Transkripte, die *ncRNA* unbekannter Funktion, erfüllte das Screening-Kriterium vollständig und zeigte eine selektive, für die mOR37-Rezeptoren charakteristische geclusterte Expression in einzelnen OSNs (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Die beiden anderen Transkripte *Tmsb10* (Abb. 3.15) und *Gng8* (Abb. 3.16) wiesen zwar eine gewebe- und entwicklungsspezifische aber keine zelltypspezifische Expression auf.

#### **Tmsb10**

*Tmsb10* ist im embryonalen Riechepithel (E16) stark in einem von basal nach apikal zunehmenden Gradienten exprimiert (Abb. 3.15 B'-C'). Im frühen postnatalen Riechepithel (P7) ist das *Tmsb10*-Signal dagegen auf die unteren zwei Drittel der Riechsinneszellschicht (mit Ausnahme der Basalzellschicht) begrenzt (Abb. 3.15 B-C). Dieses Expressionsmuster ist konsistent mit der Annahme, dass *Tmsb10* in jungen postmitotischen, aber nicht mehr in ausgereiften OSNs exprimiert ist. Im OE tritt *Tmsb10* also tatsächlich wohl nur in unreifen, nicht aber spezifisch in mOR37B-positiven unreifen OSNs auf. Eine Veränderung des Expressionsmusters entlang der anterior-posterioren Achse im OE konnte nicht festgestellt werden. Im *Bulbus olfactorius* (OB) ist eine klare Reduktion des embryonal noch in allen außer der glomerulären Schicht verbreiteten Signals (Abb. 3.15 D') zu einem stark differenzierten Signal bei P7 zu erkennen, welches sich auf die glomeruläre Schicht mit den periglomerulären Zellen sowie die Mitralzellschicht beschränkt (Abb. 3.15 D). In der Vergrößerung sind einzelne stark markierte Zellen in der unteren Mitralzellschicht deutlich zu erkennen. Als receptives Sinnesepithel des akzessorischen Geruchssystems zeigt das Vomeronasalorgan (VNO) sowohl embryonal als auch früh-postnatal eine gleich bleibend starke und unveränderte *Tmsb10*-Expression (Abb. 3.15 E+E').

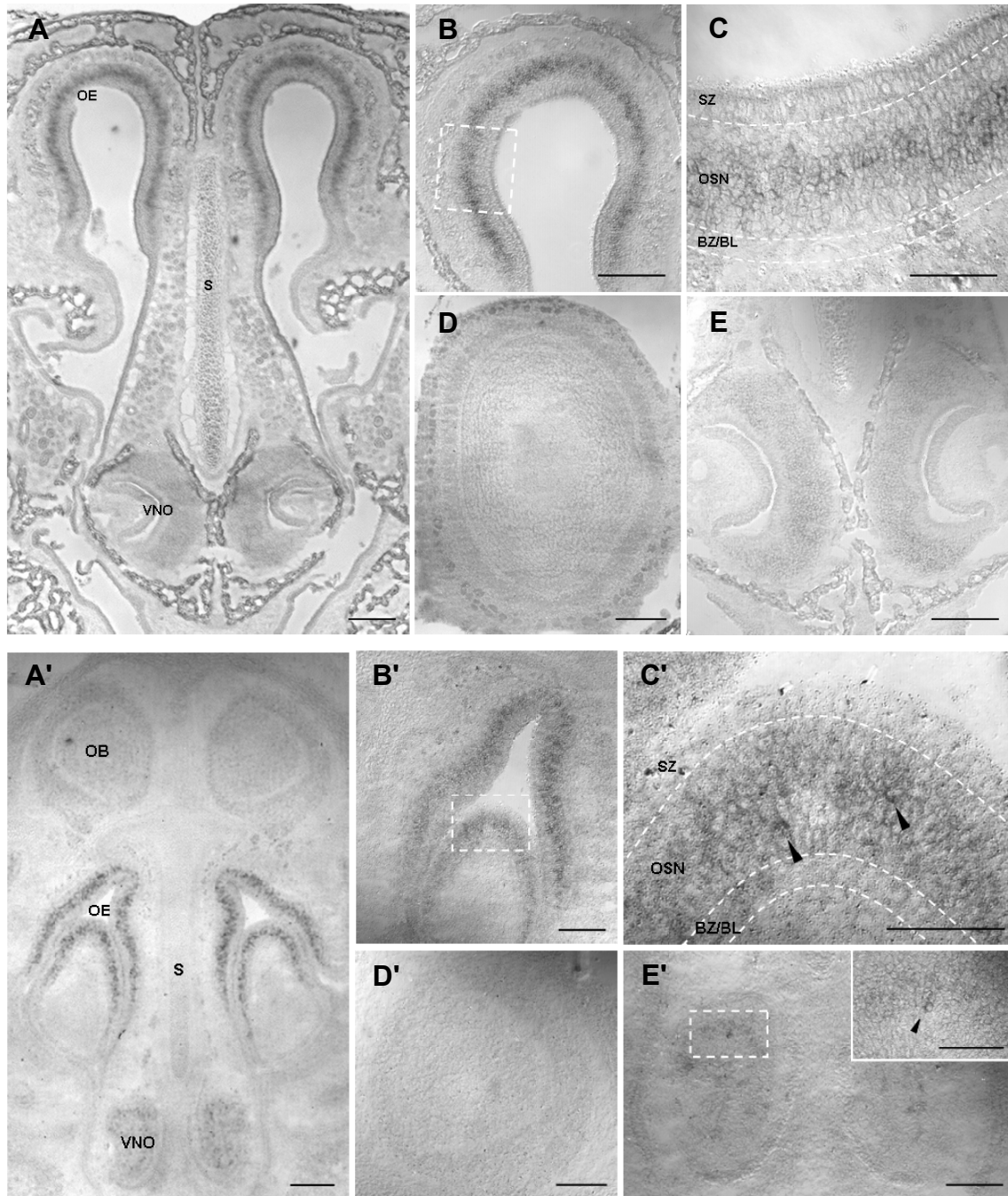


**Abb. 3.15: Expression von *Tmsb10* im Geruchssystem der Maus.** Die *in-situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden für *Tmsb10* an koronalen Gewebeschnitten von Nase/Kopf in den Altersstadien P7 (A-E) und E16 (A'-E') zeigt eine starke Expression von *Tmsb10* im OE (B, B', C, C'), OB (D, D') und dem VNO (E, E'). BZ/BL: Basalzellschicht mit Basallamina, OB: *Bulbus olfactorius*, OE: olfaktorisches Epithel, OSN: olfaktorische sensorische Neuronen, S: Septum, SZ: Stützzellschicht, VNO: Vomeronasalorgan. Maßstab: 200 µm (A, B, D, E; A', B', C', E'), 50 µm (C, D Ausschnitt, C').

### **Gng8**

*Gng8*-mRNA ist im gesamten Riechepithel sowohl bei E16 (Abb. 3.16 A'-C') als auch bei P7 (Abb. 3.16 A-C) moderat, aber noch spezifischer exprimiert als die *Tmsb10*-mRNA. Das Signal ist dabei vorwiegend in den mittleren bis unteren OE-Schichten lokalisiert, etwa dem apikalen Peak der *Tmsb10*-Expression entsprechend. Bei E16 fallen einzelne, stark *Gng8*-positive OSNs auf (Abb. 3.16 C', Pfeilmarkierung). Auch für *Gng8* konnten keine Veränderungen in der Expression von anterior nach posterior im OE festgestellt werden. Das *Gng8*-Signal im sensorischen Epithel des früh-postnatalen VNO ist homogen und eher

schwach ausgeprägt. Analog zum OE sind auch hier bei E16 einzelne vomeronasale Rezeptorneuronen (VRNs) mit einem auffällig höheren Gehalt an *Gng8*-mRNA zu finden (Abb. 3.16 E'). Im embryonalen *Bulbus olfactorius* ist bei E16 keine *Gng8*-Expression nachweisbar, postnatal (P7) dagegen ein deutliches Signal in den Glomeruli.



**Abb. 3.16: Expression von *Gng8* im Geruchssystem der Maus.** *In-situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden für *Gng8* an koronalen Gewebeschnitten von Nase/Kopf der Entwicklungsstadien P7 (**A-E**) und E16 (**A'-E'**) zeigt eine moderate Expression von *Gng8* insbesondere in einer mittleren Schicht des gesamten OE (**B, C**) sowie eine stärkere Expression in einzelnen Zellen des OE (**B', C'**) und VNO (**E'**) bei E16. Der Riechkolben (OB) weist kein *Gng8*-Signal bei E16 (**D'**), jedoch ein deutliches Signal in den Glomeruli bei P7 (**D**) auf. BZ/BL: Basalzellschicht mit Basallamina, OB: *Bulbus olfactorius*, OE: olfaktorisches Epithel, OSN: olfaktorische sensorische Neuronen, S: Septum, SZ: Stützzellschicht, VNO: Vomeronasalorgan. Maßstab: 200 µm (**A, A', B, D, E**), 100 µm (**B', D', E'**), 50 µm (**C, C', Ausschnitt E'**).

Insgesamt ist das Expressionsmuster konsistent mit der Annahme, dass *Gng8* in jungen postmitotischen OSNs, noch später als *Tmsb10* und vermutlich während der Axonextension benötigt wird. *Tmsb10* und *Gng8* sind demnach vermutlich tatsächlich während der späten Differenzierung und nicht in ausgereiften OSNs, jedoch nicht wie erwartet mOR37B-spezifisch, exprimiert. Im Fall von *Gng8* ist eine zelltypspezifische Funktion aufgrund der beobachteten stärkeren Expression in einzelnen OSNs und VRNs nicht auszuschließen.

### **ncRNA**

Die mit 87 % häufigste Sequenz unter den analysierten differenziellen Klonen ist die der *ncRNA* mit noch unbekannter Funktion. Nach Hybridisierung koronaler Gewebeschnitte der Nase von mOR37B-EGFP-Mäusen mit antisense-RNA-Sonden für diese Sequenz zeigte sich ein hochselektives Expressionsmuster des *ncRNA*-Transkriptes in einzelnen Riechsinneszellen des embryonalen und postnatalen Riechepithels. Die charakteristische Verteilung dieser meist sehr stark markierten Neuronen entspricht eindeutig dem Verteilungsmuster der untersuchten mOR37B-Subpopulation von Neuronen im Riechepithel (Abb. 3.17 A-C). Im Gegensatz zu dem Signal im Riechepithel wiesen Riechkolben und Vomeronasalorgan keine *ncRNA*-Expression auf (Abb. 3.17 D+E). Inwieweit die *ncRNA* exklusiv nur in mOR37B-Neuronen exprimiert ist, sollte der kombinierte Einsatz von *ncRNA-in-situ*-Hybridisierung und EGFP-Immunfärbung zum Nachweis mOR37B-exprimierender Neuronen herausstellen. Da die intrinsische Fluoreszenz des mit dem mOR37B-Rezeptor ko-exprimierten EGFPs nach Durchführung der *in-situ*-Hybridisierung relativ schwach ist, war für eine zweifelsfreie Detektion des EGFP-Signals die zusätzliche Immunmarkierung nötig. EGFP-positive Neuronen wurden dann direkt nach der für *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie gemeinsamen Antikörperinkubation fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert, bevor im Anschluss die colorimetrische Detektion der *ncRNA*-Hybride erfolgte. Diese Verfahrensweise war notwendig, da verschiedene getestete Fluoreszenz-Substrate für die *in-situ*-Hybridisierung (HNPP/FastRed, Alexa568-Thyramide) aufgrund sehr ungünstiger Signal-Rausch-Verhältnisse nicht eingesetzt werden konnten, jedoch das colorimetrische Farbpräzipitat das Fluoreszenzsignal der Immunhistochemie überdeckte. Beide Signale wurden schließlich ebenso wie das der DAPI-Kernfärbung getrennt als digitale Graustufenbilder aufgenommen, zur Deckungsgleiche gebracht und in RGB-Falschfarben dargestellt. Die beschriebene Kombination von *ncRNA*-ISH und EGFP-Immunfärbung zeigt eindeutig eine Co-Lokalisation beider Signale in mOR37B-exprimierenden Neuronen des embryonalen (Abb. 3.18 B'-E', B''-E'') und postnatalen Riechepithels (Abb. 3.17 B'-E', B''-E''). Die Co-Lokalisationsrate liegt für das E16-OE bei 100 %, für alle im P7-OE identifizierten

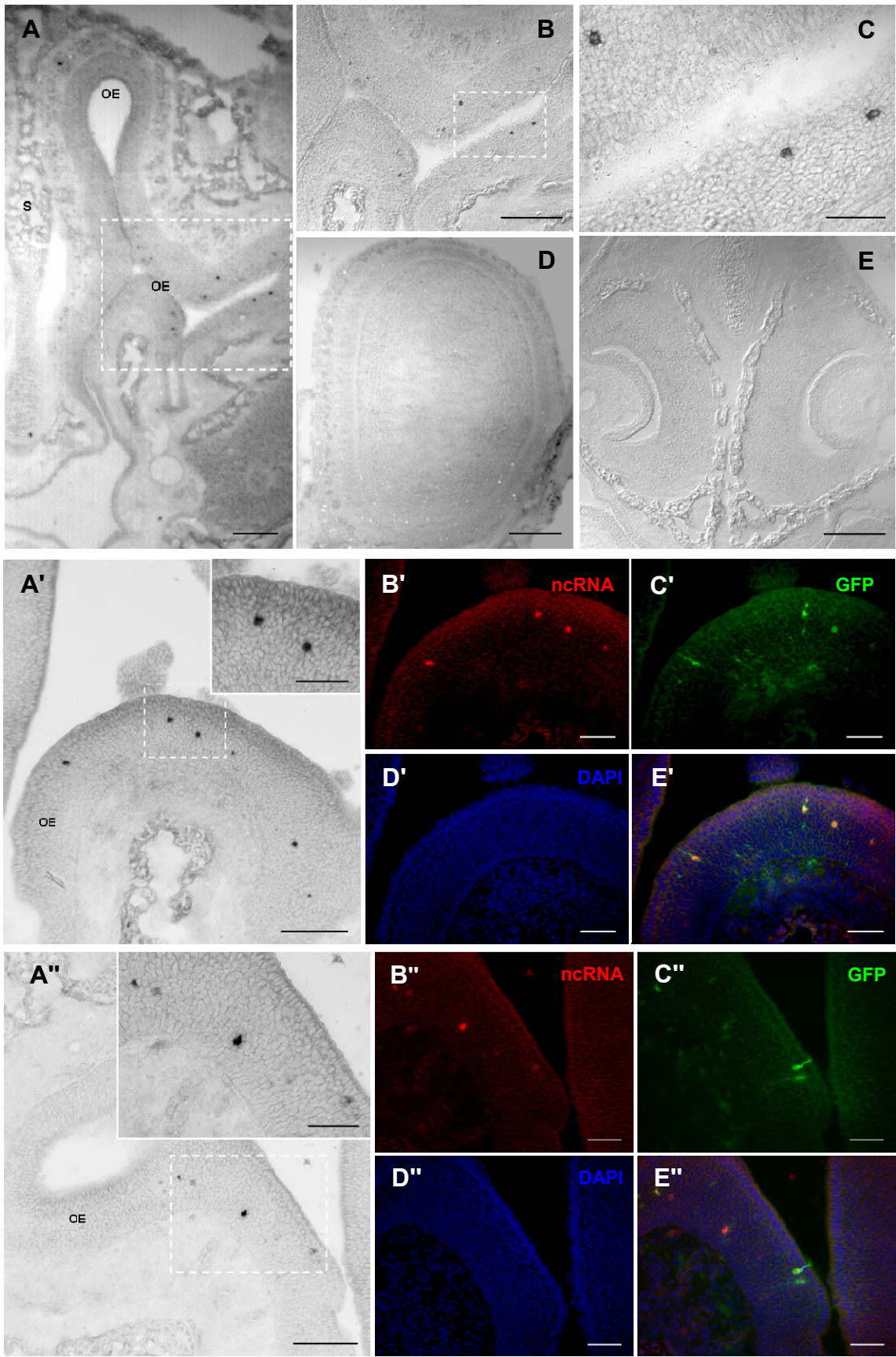


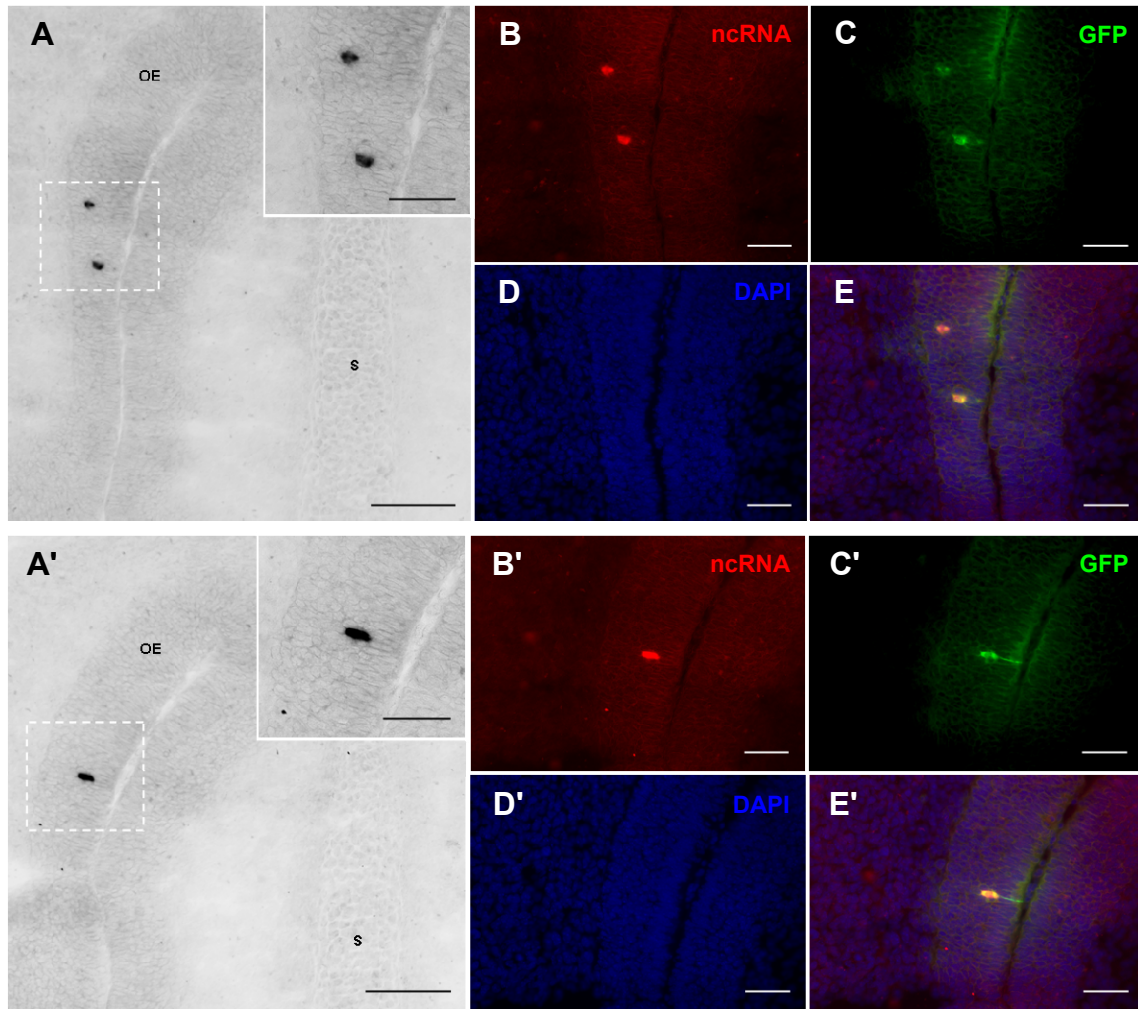
mOR37B-exprimierenden OSNs jedoch darunter. Im postnatalen OE wurden zudem ncRNA<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. Zellen, die nur die ncRNA, aber keine Spur von EGFP exprimieren (ncRNA<sup>+</sup>/EGFP<sup>-</sup>), wurden dagegen nicht gefunden, lediglich vereinzelte ncRNA<sup>+</sup>-OSNs mit sehr schwachem EGFP-Signal.

Unreife, sich verdrahtende OSNs befinden sich bei P7 vorwiegend in den unteren, basalen zwei Dritteln des Riechepithels über der Basallamina. Reife, bereits verdrahtete OSNs mit Apikaldendrit liegen dagegen im mittleren und oberen Drittel des Epithels. Man sieht deutlich, dass Neuronen basaler Schichten viel geringere EGFP-Signale aufweisen verglichen mit denen des apikalen Epithelbereiches, die stark EGFP-positiv sind (Abb. 3.17 C'+C'', Abb.3.18 C'+C''). Die ncRNA-positiven Neuronen basaler Epithelbereiche weisen deutlich höhere Mengen an ncRNA im Vergleich zu den mehr apikal im Epithel lokalisierten Neuronen auf, sodass man von einem von basal nach apikal ansteigenden Gradienten sprechen kann. Diese Beobachtungen treffen, wenn auch nicht so eindeutig wie bei P7, ebenfalls für das embryonale Riechepithel bei E16 zu (Abb. 3.18 B-E, B'-E'). Insgesamt sind die Daten also konsistent mit der Annahme, dass die gefundene ncRNA, exakt der Screening-Strategie entsprechend, extrem spezifisch und in großen Mengen in unreifen Neuronen der Spezifität mOR37B exprimiert ist.

---

**Abb. 3.17: Expression von ncRNA im Geruchssystem der Maus im Entwicklungsstadium P7. (A-E, A', A'')** *In-situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden für ncRNA an koronalen Gewebeschnitten der Nase zeigt eine selektive und mOR37-charakteristische Expression des ncRNA-Transkriptes in einzelnen OSNs. OB (D) und VNO (E) weisen keine ncRNA-Expression auf. Die Kombination von ncRNA-ISH und GFP-Immunfärbung (B'-E', B''-E'') zeigt eine Co-Lokalisation beider Signale in Abhängigkeit von der Zellposition (apikal-basal) im OE von mOR37B-EGFP-Mäusen. OB: *Bulbus olfactorius*, OE: olfaktorisches Epithel, OSN: olfaktorische sensorische Neuronen, S: Septum, VNO: Vomeronasalorgan. Maßstab: 200 µm (A, A', A'', B, E), 100 µm (D), 50 µm (C, A' 40x, A'' Ausschnitt, B'-E', B''-E'').





**Abb. 3.18: Expression von *ncRNA* im Geruchssystem der Maus im Entwicklungsstadium E16.** *In-situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA-Sonden für *ncRNA* an koronalen Gewebeschnitten der Nase zeigt eine selektive Expression des *ncRNA*-Transkriptes in einzelnen OSNs (**A, A'**). Eine Doppelmarkierung für *ncRNA* (ISH) und EGFP (IHC) (**B-E, B'-E'**) weist die Co-Lokalisation beider Signale in mOR37B-positiven OSNs von mOR37B-EGFP-Mäusen eindeutig nach. OE: olfaktorisches Epithel, S: Septum. Maßstab: 200  $\mu$ m (**A, A'**), 50  $\mu$ m (**B-E, B'-E'**).

## 4. DISKUSSION

Das Zentralnervensystem ist das am stärksten differenzierte Organ bei Vertebraten mit einer Vielzahl unterschiedlicher, spezialisierter Zelltypen. Das Kennzeichen neuronaler Spezialisierung auf funktionell-anatomischer Ebene ist die Konnektivität von Axonen und Dendriten, auf molekularer Ebene das für den jeweiligen Zelltyp und Aktivitätszustand charakteristischen Transkriptom. Neuronale Spezifität im olfaktorischen System ist durch den von einem olfaktorischen sensorischen Neuron jeweils exprimierten Geruchsrezeptor und die Rezeptor-spezifische Projektion seiner Axone auf ein bis zwei stereotype Relais-Punkte im *Bulbus olfactorius* - die Glomeruli - gegeben. Die dem zugrunde liegenden entwicklungsbiologischen Differenzierungsprozesse sind multifaktoriell und raum-zeitlich stark regulierte, sequenzielle Abläufe und damit in ihrer Gesamtheit kaum zu analysieren. Gerade aufgrund dieser Problematik erwachsen mit der Fokussierung auf einzelne neuronale Subtypen und der Charakterisierung ihrer Genexpressionsprofile in definierten Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstadien potente Ansätze zur Aufklärung neuro-entwicklungsbiologischer Mechanismen. Dagegen spiegeln Genexpressionsanalysen auch von noch so präzise präparierten Gewebeproben wie z.B. einer definierten Schicht eines bestimmten kortikalen Areals oder eines definierten Kerngebietes im Gehirn immer nur den Status von Mischpopulationen sich massiv unterscheidender Zelltypen wider.

In der Literatur wurden bisher keine, auf individuellen Zellen basierende Transkriptom-Analysen beschrieben, die differenzierende olfaktorische sensorische Neuronen einer bestimmten Rezeptorspezifität untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher systematisch mittels doppelt-differenzieller Einzelzell-Transkriptomanalyse nach dem mit der Geruchsrezeptorspezifität mOR37B assoziierten Differenzierungsapparat gesucht, der spezifisch in unreifen OSNs dieses Rezeptortyps zum Zeitpunkt der „Verdrahtung“ exprimiert wird. Die verfolgte Screening-Strategie eliminierte dabei exprimierte Transkripte reifer mOR37B-OSNs sowie unreifer OSNs anderer Rezeptorspezifitäten, was darauf abzielte, mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierte Transkripte zu identifizieren.

### 4.1 Methodische Herausforderung Einzelzell-Transkriptom-Analyse

Die Individualität einzelner OSNs während der Differenzierung drückt sich in Form qualitativer und quantitativer Unterschiede zwischen den jeweiligen Einzelzell-Transkriptomen aus. Um diese wahrscheinlich sehr geringen aber dennoch bedeutenden Differenzen durch Analysemethoden nachweisen zu können, wurde in dieser Arbeit besonderer Wert auf die Auswahl der optimalen Methoden zur Einzelzellisolierung und Transkriptomanalyse sowie deren Kontrolle gelegt. Zur Isolierung individueller Zellen

existiert neben der klassischen manuellen Sortierung eine Reihe von zum Teil automatisierten Techniken wie FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) oder Laser Capture Microdissection (LCM). Im Vergleich zur manuellen Sortierung sind diese Verfahren jedoch nicht in der Lage, kontaminationsfrei Einzelzellen zu selektieren. Bei der FACS-Methode besteht z.B. die Gefahr der Isolierung von Zell-Dupletten sowie der Co-Sortierung von Zelldebris. Das bei der Isolierung mittels LCM ausgeschnittene Einzelzellmaterial ist ebenso nie frei von umgebendem und damit kontaminierendem Gewebe, so dass hier eindeutig die manuelle Einzelzellisolierung die Methode der Wahl war.

Die anschließende Transkriptomanalyse des Einzelzellmaterials erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch klassisches Hybridisierungsscreening von Einzelzell-cDNA-Bibliotheken. Andere Verfahren wie z.B. MicroArray- und SAGE-Analyse sind im Vergleich dazu übersensitiv. Zur Vermeidung falsch-positiver Signale nach Amplifikation des Einzelzell-Transkriptoms sollte man sich aber nur auf starke Unterschiede in der Transkriptrepräsentation verlassen. Für den Zweck, nur starke transkriptionelle Unterschiede auszulesen, sind MicroArray- und SAGE-Studien allerdings überproportional teuer und nicht besser geeignet als ein Screening von cDNA-Bibliotheken.

#### **4.1.1 Eine globale Amplifikationsstrategie zur Generierung von 3'-cDNA-Tags aus Einzelzellen als Basis für differenzielle Transkriptom-Analysen**

Basierend auf einem von Brady & Iscove publizierten Grundprotokoll (Brady und Iscove, 1993) wurde eine Strategie zur Umwandlung von Einzelzell-mRNA von Riechsinneszellen in 3'-cDNA-Tags durch globale reverse Transkription und PCR-Amplifikation der mit anschließender Analyse im Format einer klonierten cDNA-Bibliothek kombiniert. Eine Reihe von Arbeiten wendeten diese Amplifikationsstrategie bereits erfolgreich für Einzelzell-Transkriptom-Analysen an (Cheng et al., 1996; Klein et al., 2002; Chiang und Melton, 2003; Tietjen et al., 2003), darunter auch Dulac und Axel (1995), die auf diese Weise die Genfamilie der Vomeronasalrezeptoren bei der Ratte entdeckten. Einzelzell-Methoden sind jedoch wegen der erforderlichen extremen Amplifikationen äußerst artefaktanfällig. Zur Minimierung möglicher Artefaktquellen musste dieses Basisprotokoll unter Kontrolle des Erfolges aller wichtigen Einzelschritte etabliert werden.

Typische eukaryotische Zellen enthalten ungefähr  $10^{-11}$ g an RNA, wovon ca. 5% auf die mRNA entfallen. Dieser vom Differenzierungsgrad des Neurons abhängige Pool transienter Kopien genomischer DNA - das Einzelzell-Transkriptom - enthält schätzungsweise  $10^5$ - $10^6$  mRNA-Moleküle entsprechend einer Masse von ~0,5 pg. Einige Arbeiten der letzten Jahre analysierten das Genexpressions-Profil individueller Neuronen (Eberwine et al., 1992; Klein et al., 2002; Tietjen et al., 2003; Hinkle et al., 2004). Aufgrund der Kleinstmengen

zugänglicher mRNA eines einzelnen Neurons benötigen diese Untersuchungen eine Amplifizierung des Ausgangsmaterials sowie den Einsatz von Hochdurchsatz-Technologien wie cDNA-Bibliotheken, Micro-Arrays oder SAGE-Analyse, um repräsentative Datensätze analysieren zu können. Trotz des Risikos falsch-positiver Resultate finden Einzelzell-Transkriptomanalysen verbreitet Anwendung, da sie bei sorgfältig kontrollierter Etablierung (Iscove et al., 2002; Klein et al., 2002) sehr reproduzierbare Genexpressions-Daten liefern, die sowohl den Typ als auch den Status des analysierten Neurons detailliert widerspiegeln. Die mRNA-Integrität ist dabei Voraussetzung für eine gleichmäßige und repräsentationstreue Amplifikation des gesamten mRNA-Pools eines individuellen OSNs - die größte Herausforderung der hier angewandten Amplifikationsstrategie.

Von exponentiellen Amplifikations-Techniken wie der PCR ist bekannt, dass sie DNA aufgrund von Unterschieden in Länge und Basenzusammensetzung mit unterschiedlicher Effizienz amplifizieren und damit die Abundanz-Beziehungen der analysierten Transkripte stark verändern können (Jeffreys et al., 1988; Freeman et al., 1999; Baugh et al., 2001). Das spezielle hier verwendete Verfahren zur globalen Amplifikation zellulärer mRNA setzt sich aus mehreren Teilreaktionen zusammen: der reversen Transkription von Erststrang-cDNA über oligo(dT)-Priming, dem anschließenden RNase H-Verdau der ursprünglichen mRNA, der 3'-Polyadenylierung der Erststrang-cDNA durch Terminale Transferase gefolgt von Zweitstrang-cDNA-Synthese und exponentieller Amplifikation der cDNA mittels PCR unter Verwendung ein und desselben oligo(dT)-Primers (SR-T<sub>24</sub>) während der gesamten Prozedur. Die durch den SR-T<sub>24</sub>-Primer in alle cDNA-Sequenzen eingebrachten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen dienten der späteren Klonierung der cDNA in eine Plasmid-Bibliothek. Die Optimierung dieses komplexen Verfahrens zielte darauf ab, mögliche Verschiebungen in der Transkript-Repräsentation zu minimieren bei gleichzeitiger Erhöhung der Detektionswahrscheinlichkeit von schwach repräsentierten Transkripten. Der erste wichtige Aspekt hierbei war die Limitierung der reversen Transkription auf wenige hundert Basen der äußersten 3'-mRNA-Sequenz („Tags“) durch drastische Reduktion der Nukleotidkonzentration und Verkürzung der Reaktionszeit. Die daraus resultierenden cDNAs waren deutlich kürzer (~500-1500 bp) als die normale Vollängen-cDNA einer Zelle, die von durchschnittlich 1,5 kb bis über 10 kb reichen kann (Okayama und Berg, 1982; Wellenreuther et al., 2004). Darüber hinaus erfolgte eine Anpassung der 3'-Polyadenylierung (Homopolymer-Tailing) hin zu einem anderen als dem Standard-Puffersystem sowie einer kurzen Denaturierung zu Reaktionsbeginn, um strikt einzelsträngige cDNA zu erhalten. Für eine optimale Polyadenylierung ist zudem ein balanciertes Verhältnis an freien 3'-OH-Enden (pmol) zu eingesetztem dATP (µM) von Bedeutung (Deng und Wu, 1981), um lediglich kurze Homopolymer-Sequenzen für eine



optimale Bindung des verwendeten SR-T<sub>24</sub>-Primers zu erzeugen ohne übermäßige Verlängerung der cDNA. Obwohl Homopolymer-Tailing-Reaktionen von ihrer Kinetik her schwierig steuer- und kontrollierbar sind, haben sie im Vergleich zur Ligation von Linker-Adaptoren den großen Vorteil, dass die noch unamplifizierte Einzelzell-Probe ohne Verluste von cDNA-Material durch eine Aufreinigung direkt durch PCR amplifiziert werden kann. All diese Maßnahmen zusammen dienten letztlich dem Zweck, eine gleichmäßige Amplifikation aller cDNAs eines individuellen OSNs entsprechend ihrer Repräsentation über die gesamten 65 PCR-Zyklen zu gewährleisten. Zudem wurde in den nach dem doppelt-differenziellen Screening als mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifisch identifizierten 192 Klonen nur *ein* Primer-Dimer identifiziert (siehe Abb. 3.14 A), was die Spezifität des etablierten Verfahrens zur Amplifikation von Einzelzell-Transkriptomen für mRNA-Transkripte bestätigt und auch den Erfolg der aufwändigen Protokoll-Optimierung zeigt.

#### **4.1.2 Die Isolierung von individuellen OSNs war kontaminationsfrei möglich und hatte keinen Einfluss auf die Transkriptrepräsentation**

Die Schwierigkeit bei Einzelzell-Untersuchungen besteht vor allem in der Erhaltung der größtmöglichen Integrität der zu analysierenden Einzelzell-mRNA, die permanent der Gefahr von Degradation und Repräsentationsverformung ausgesetzt ist. Erste Maßnahme zur Umgehung dieses Problems war die Etablierung eines effektiven und dennoch schonenden Protokolls zur Vereinzelung von olfaktorischem Epithel, sodass ausgehend von einer Einzelzellsuspension mit einer Zellvitalität >70 % und einem hohen OSN-Anteil von >20 % individuelle reife und unreife OSNs isoliert werden konnten. Dies geschah manuell unter visueller Kontrolle. Die Vorteile manueller Sortierung gegenüber der automatischen Zellsortierung mittels FACS (fluorescence activated cell sorting), die beispielsweise zur Isolierung corticospinaler Motoneuronen (Arlotta et al., 2005) und schwach repräsentierter neuronaler Stammzellen (Rietze et al., 2001) oder für die Anreicherung bestimmter OSN-Populationen (Liberles und Buck, 2006) angewandt wurde, sind offensichtlich: Es konnte eine Vorauswahl morphologisch intakter *EGFP*-positiver OSNs unter visueller Kontrolle erfolgen und durch mehrmaliges Waschen der isolierten OSNs eine Verschleppung von Kontaminationen aus der Zellsuspension vermieden werden. Nicht zuletzt ist die manuelle Sortierung eine deutlich schonendere Methode für die bereits durch den Dissoziationsprozess vorgeschädigten Neuronen im Vergleich zur Sortierung per FACS und damit besser für die resultierende mRNA-Integrität. Zudem konnten hier keine Pools gleichartiger Zellen gesammelt werden, da jede einzelne Zelle nach ihrer Isolierung auf charakteristische Reifemarker hin analysiert werden musste.

Durch eine Reihe von Maßnahmen wie die Arbeit unter Reinstraumbedingungen (Sterilbank, sterile und RNase-freie Lösungen) und gründliches Waschen der Einzelzellen

ist es erfolgreich gelungen, individuelle OSNs kontaminationsfrei zu isolieren. In keiner der mitgeführten Negativkontrollen waren nach PCR-Amplifikation genspezifische Transkripte im Southern Blot nachweisbar. Um Kontaminationen der späteren Einzelzell-cDNA-*Tags* aufgrund von genomischer DNA aus der Zellsuspension ausschließen zu können, erfolgte die enzymatische Zelldissoziation in Gegenwart von DNase I, um die genomische DNA abgestorbener Zellen zu verdauen (siehe 3.1.1). Aber auch die *in* jeder isolierten Zelle vorhandene genomische DNA stellte kein Problem für die poly(A)-Spezifität der darauf folgenden Synthese- und Amplifikationsschritte dar. Alle in den final identifizierten Sequenzen vorkommenden 3'-poly(A)-Bereiche waren echte Transkript-poly(A)-Tails und nicht etwa über Bindung des verwendeten SR-T<sub>24</sub>-Primers an A-Repeats genomischer DNA entstandene *Tags*, wie das 20 Nukleotide direkt 5' des polyA-Tails identifizierte Polyadenylierungssignal AATAAA verdeutlicht. Zudem wurde das Transkriptom einzelner OSNs durch die hier angewandte Zellvereinzelungs- und Isolierungsprozedur nicht signifikant verändert. Immerhin führen axonale Läsionen wie eine Axotomie in der Regel zu retrograder Degeneration des betreffenden Neurons (Jacob, 1951). Am empfindlichsten gegenüber enzymatischer Vereinzelung und anschließender manueller Isolierung sind demnach reife, bereits vollständig verdrahtete OSNs. Das Verhältnis der Markergene beta-Aktin, OMP und G<sub>olf</sub> in der von reifen OSNs dominierten Gesamt-RNA aus olfaktorischem Epithel (siehe Abschnitt 3.1.3; Abb. 3.7) war auch nach der Isolierung im Transkriptom einzelner reifer OSNs erhalten geblieben (Abb. 3.12).

#### **4.1.3 Die extreme Amplifikation von 3'-cDNA-*Tags* durch PCR führt nicht zu Verschiebungen in ihrer Repräsentation**

Die durch exponentielle Amplifikationsmethoden wie PCR möglichen unerwünschten Repräsentationsverschiebungen in einem Einzelzell-Transkriptom können enorm sein. Im ungünstigsten Fall könnte nach den hier durchgeführten 65 PCR-Zyklen ein in der mRNA vorhandener Repräsentationsunterschied zweier Transkripte bei einer nur 10% höheren Amplifikationseffizienz eines der beiden Transkripte um den Faktor 1000 verschoben werden. Somit würden cDNA-Verhältnisse resultieren, die mit der ursprünglichen mRNA-Repräsentation letztlich nichts mehr zu tun haben.

Mit Hochdurchsatzverfahren wie Microarray-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass nach exponentieller Amplifikation des Transkriptoms von Einzelzellen mit optimierten Protokollen, wie dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten, die Abundanzbeziehungen zwischen den Transkripten erhalten bleiben und Einzelzell-cDNA-Bibliotheken mit mehr als 72 % Polyadenylierungssignal-enthaltenden Klonen generiert werden können (Iscove et al., 2002). Der Erfolg der hier durchgeführten intensiven Protokoll-Optimierung wurde anhand einer vergleichenden Expressionsanalyse ausgewählter und für OSNs charakteristischer



Gene (beta-Actin, OMP, G<sub>olf</sub>, Olf-1, Gap43) nachgewiesen. Einzelzell-Äquivalente an Gesamt-RNA aus Riechepithel und daraus amplifizierter cDNA wurden durch Northern- bzw. Southern-Analyse miteinander verglichen und zeigten keinerlei signifikante Unterschiede im Expressionsgrad der untersuchten Gene. Zwar können aufgrund des geringen Stichprobenumfangs von lediglich fünf analysierten Genen Veränderungen in der Repräsentation einzelner cDNAs nicht ausgeschlossen werden, die Wahrscheinlichkeit drastischer Verschiebungseffekte scheint allerdings sehr gering zu sein (siehe Abb. 3.7). Dies wird besonders an den finalen Sequenzen deutlich, da unterschiedliche *Tags* jedes einzelnen Transkripts durch die nicht systematisch sondern zufällig abbrechende Transkription verschiedene Längen haben und somit explizit das Risiko einer unterschiedlichen Amplifikation besteht. Die sicherste Signatur eines PCR-„Biasing“ wäre die extreme Erhöhung der Repräsentation eines oder mehrerer Transkripte, da schon sehr kleine Unterschiede der Amplifizierbarkeit nach 65 PCR-Zyklen zu so massiven Veränderungen führen. Dies ist in keinem von insgesamt über 1000 analysierten Fällen (je 6 Gene von 184 Einzelzell-Transkriptomen) beobachtet worden (siehe Abschnitt 3.2.1). Die individuellen Expressionsprofile aller für den cDNA-Screen verwendeten Einzelzellen (siehe Abb. 3.12) spiegeln eindeutig interindividuelle Unterschiede der Genexpression der einzelnen OSNs wider und keine zufälligen, PCR-generierten Artefakte. Somit konnte auch die Identität der gepickten Zellen eindeutig bestimmt werden. Die für die nachfolgende Klonierung verwendeten Einzelzell-Pools aus jeweils fünf Zellen der Spezifitäten mOR37B<sub>unreif</sub> (Zelltyp I), mOR37B<sub>reif</sub> (Zelltyp M) und ORX<sub>unreif</sub> (Zelltyp X) wurden streng selektiert auf 100 %-ige Erfüllung eines zelltypspezifischen Expressions-Codes. Die ORX<sub>unreif</sub>-Population war dabei zwar unvermeidlich heterogen, enthielt aber mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit keine mOR37B-Neuronen, da diese aufgrund ihrer Expression in einem eng umgrenzten Epithelbereich separat präpariert werden konnten - der Grund für die Wahl der transgenen mOR37B-EGFP-Maus.

#### **4.1.4 Eine neue Ligationstechnik ermöglicht die hocheffiziente und repräsentationstreue Klonierung von 3'-cDNA-Tag-Bibliotheken**

Übliche Protokolle für die Herstellung von cDNA-Bibliotheken beruhen meist auf direktonaler Klonierung von DNA-Fragmenten in den Bakteriophagen  $\lambda$  oder einen Plasmidvektor, wobei DNA-Insert und Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten werden zur Erzeugung nicht-komplementärer „sticky ends“. So kann das Fragment in bestimmter Orientierung in den Vektor ligiert und gleichzeitig die Selbstligation des Vektors unterbunden werden (Ausubel, 1992ff; Sambrook, 2001). Eine gerichtete Klonierung von cDNA-*Tags* über nicht-komplementäre Enden wäre hier jedoch nur über ein polyG-Tailing der Erststrang-cDNA möglich gewesen, kam aber aufgrund der Neigung GC-

reicher DNA-Sequenzen zu robuster Sekundärstrukturbildung und Kreuzhybridisierung, die problematisch für PCR-Amplifikationen und Hybridisierungen sind, nicht in Frage. Zielt das Screening zudem darauf ab, unter den auf circa 20.000 Spezies geschätzten Transkripten in einem Einzelzell-Transkriptom auch mittel bis schwach repräsentierte zu detektieren, spielen neben qualitativen auch quantitative Anforderungen eine wichtige Rolle (siehe dazu 3.2.2). Die Klonierung solch komplexer cDNA-Populationen erfordert daher eine Ligationmethode, die möglichst alle Transkripte entsprechend ihrer Repräsentation kloniert und damit verlustfrei und effizient arbeitet. Ein Maximum an quantitativer Effizienz der Klonierung ist erreicht, wenn 100 % der zu analysierenden, auf Membranfiltern immobilisierten Klone ein cDNA-Fragment enthalten, qualitative Effizienz meint dagegen, dass 100 % der Klone ausschließlich *ein* inseriertes cDNA-Fragment enthalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren — die *3R*-Ligation (route and rate restricted ligation) — etabliert, welches zur kontrollierten und hocheffizienten Klonierung von cDNA in einen Plasmid-Vektor Restriktionsverdau und Ligation in einer 3-Schritt-Reaktion miteinander kombiniert (siehe 3.1.4). Basierend auf der Schnittstellen-Komplementarität von *Sal*-I-geschnittenem Vektor und *Xho*-I-geschnittener, dephosphorylierter cDNA können beide Komponenten nicht-direktional ligiert werden. In Gegenwart von *Sal* I werden somit Vektor-Vektor-Produkte permanent gespalten, sodass nach finaler Zirkularisierung ausschließlich Vektor-cDNA-Produkte als *klonierbare* Produkte vorliegen. Voraussetzung hierfür war ein optimiertes Verhältnis an freien DNA-Enden von Vektor zu cDNA mit dem Resultat, dass nach Transformation in Bakterien und Analyse mittels Colony-PCR eine cDNA-Bibliothek mit nahezu 100% cDNA-tragenden Klonen generiert werden konnte. Ein Kontrollverdau lieferte zudem den Beweis, dass 97 % aller Klone jeweils nur ein einzelnes cDNA-Fragment enthalten. Das Verfahren wird damit den hohen Erwartungen an Qualität und Quantität gerecht. Repräsentationsverschiebungen durch das Ligationsverfahren können mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Längenverteilungen der Insertsequenzen nach Colony-PCR (siehe Abb. 3.8 C) bzw. nach Sequenzierung der finalen differenziellen Klone (Abb. 3.14 A) der Längenverteilung der unklonierten *Tags* entspricht. Veränderungen in der Länge wären hier das wichtigste Argument für unterschiedliche Klonierungs- und Transformationseffizienz.

## 4.2 Beurteilung der mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierten Transkripte hinsichtlich ihrer Repräsentation und ihrer Expression im olfaktorischen System

### 4.2.1 Allgemeine Anmerkungen zu den Einflussfaktoren der Transkriptrepräsentation

Die in der vorliegenden Arbeit durch differenzielles Screening miteinander verglichenen reifen (Typ M) und unreifen (Typ I) mOR37B-OSNs besitzen zwar eine hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit, dennoch sind relativ große transkriptionelle Unterschiede zwischen dem I- und dem M-Zelltyp zu erwarten. Der gesamte neuronale „Verdrahtungsapparat“ unreifer OSNs sollte nach erfolgreicher Zielgebietsinnervation in seiner Expression herunter reguliert werden, was Lenkungs- und Adhäsionsrezeptoren, deren Signaltransduktionskaskaden sowie Elemente der Zytoskelett- und Membrandynamik beinhaltet. Im Gegenzug dazu sollte eine Vielzahl von Genen für funktionelle Synapsen sowie die Signaltransduktionskaskade reifer OSNs verstärkt exprimiert werden. Wenngleich die geringsten interzellulären Unterschiede zwischen dem I- und X-Zelltyp zu erwarten sind, dürfte aufgrund der Inhomogenität der in den X-cDNA-Pool eingegangenen unreifen OSNs auch hier eine größere Zahl differenzieller Transkripte auftreten. Diese sollten primär in dem für die jeweiligen unreifen OSNs spezifischen Differenzierungsapparat liegen. Nach Subtraktion aller sowohl in der M- als auch der I-cDNA-Population enthaltenen Klone ist folglich nur noch ein Bruchteil an mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen Sequenzen übrig. Werden überdies noch Sequenzen unreifer OSNs anderer Rezeptorspezifitäten (X-Zelltyp) abgezogen, um generelle Unreifemarker wie z.B. *Gap-43* oder allgemein mit neuronalem Auswachsen korrelierte Transkripte zu eliminieren, sollte die resultierende Anzahl an differenziellen Klonen die Unterschiede mit größter Abundanz widerspiegeln. In der Praxis konnten letztlich nur fünf verschiedene, differenziell in unreifen mOR37B-OSNs exprimierte Transkripte identifiziert werden (siehe Abb. 3.14). Ursache für diese geringe Zahl an differenziellen Klonen ist sehr wahrscheinlich eine im Vergleich zu den Sonden des M- und X-cDNA-Pools deutlich schwächere Markierung der I-Pool-cDNA-Sonde (siehe dazu auch Abb. 3.13 A), da nur 50-60 % der auf den I-Koloniefiltern vorhandenen Klone markiert wurden. Die in der I-Sonde enthaltenen, niedrig-abundanten Transkripte dürften demnach nicht ausgereicht haben, um eine detektierbare Markierung all ihrer Target-Klone auf den I-Koloniefiltern zu erzielen. Wenn einige dieser niedrig-abundanten Transkripte dann zufälligerweise auch noch mit der M- oder X-cDNA-Sonde markiert wurden, konnten scheinbar rein blaue bzw. rote Klone entstehen, die in der I-cDNA-Population aber real nicht vorkommen können. Unterschiede mit geringerer Abundanz müssten sich durch weiteres Screenen einer größeren Anzahl an Kolonien

jederzeit finden lassen. Die gefundenen geringen transkriptionellen Unterschiede sind daher eher der Technik als der Wirklichkeit geschuldet.

Je nach ihrer ursprünglichen Repräsentation im Einzelzell-Transkriptom kamen die differenziellen, nach dem doppelt-differenziellen Screening der mOR37B<sub>unreif</sub>-cDNA-Bibliothek identifizierten Transkripte wie erwartet mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. Mit ~ 88 % entfiel der überwiegende Teil der sequenzierten Klone auf eine nicht-kodierende RNA-Sequenz unbekannter Funktion (*ncRNA*, für: non-coding). Diese Häufigkeit lässt auf eine sehr starke Expression der ncRNA in unreifen mOR37B-exprimierenden Neuronen schließen, nicht zuletzt aufgrund der nachweislichen Repräsentationstreue des hier verwendeten Amplifikationsprotokolls (siehe 3.1.3). Vier weitere potenziell differenzielle Transkripte konnten identifiziert werden, darunter mit einer Häufigkeit von knapp 6 % die G-Protein gamma-Untereinheit 8 (*Gng8*) und mit je 0,5 % beta-Thymosin 10 (*Tmsb10*), das Ribosomale Protein L29 (*Rpl29*) sowie NADH-Dehydrogenase 1, beta-Untereinheit 9 (*Ndufb9*). Lediglich ein Klon von 192 sequenzierten entsprechend einer Repräsentation von 0,5 % enthielt eine eindeutig durch Primer-Dimerisierung entstandene nonsense-Sequenz, die definitiv zu den Hintergrund-Signalen zu zählen ist. Nach Analyse der Transkript-Expression *in situ* zeigte sich jedoch für zwei der drei analysierten Transkripte, *Tmsb10* (Abb. 3.15) und *Gng8* (Abb. 3.16), kein mOR37B-spezifisches und damit nicht-differenzielles Expressionsmuster. Dass nicht alle gefundenen Transkripte ausschließlich mOR37B-spezifisch exprimiert sind, liegt in der doppelt-differenziellen Screening-Strategie begründet, denn eine absolute Differentialität ist von Hybridisierungstechniken generell nicht zu erwarten.

#### **4.2.2 Nach seinem Expressionsmuster ist *Tmsb10* nicht spezifisch für mOR37B<sub>unreif</sub> aber für unreife OSNs**

Thymosin-beta 10 (*Tmsb10*) ist ein polares, 5 kDa kleines Peptid, welches zur  $\beta$ -Thymosin-Familie gehört.  $\beta$ -Thymosine sind intrazellulär für die Bindung von G-Actin-Monomeren und deren Bereitstellung für Reorganisationsprozesse des Cytoskeletts verantwortlich (Huff et al., 2001). Lin und Morrison-Bogorad konnten die mRNA von *Tmsb10* neben verschiedenen weiteren Geweben im Gehirn der Ratte nachweisen und beschrieben eine differenzielle Regulation während der Entwicklung (Lin und Morrison-Bogorad, 1990). Thymosin-beta 10 mRNA sowie das Peptid sind im sich entwickelnden Rattenhirn bereits am Embryonaltag 9 exprimiert, wobei das Expressionsmaximum von *Tmsb10* zwischen E15 und P3 erreicht wird, gefolgt von einer Reduktion auf ca. 5 % bis zum Postnatalstadium P14 (Lugo et al., 1991). Veränderungen des Cytoskeletts sind eine elementare Voraussetzung für die Proliferation, Migration und Neuritenelongation von

Neuronen während der Hirnentwicklung und implizieren aufgrund der beschriebenen Eigenschaften eine Beteiligung von *Tmsb10* an diesen Prozessen.

Das *Tmsb10*-Transkript wies unter allen sequenzierten differenziellen Klonen lediglich eine Häufigkeit von 0,5 % auf (Abb. 3.14). Ungeachtet dieser niedrigen Frequenz, die im Übrigen der Häufigkeit detektierter Primer-Dimere entspricht, war *Tmsb10* aufgrund der in der Literatur beschriebenen Expression *in vivo* sowie der bekannten Funktionen ein interessantes Kandidatenmolekül für eine Expressionsanalyse *in situ*. Das Expressionsmuster von *Tmsb10*-mRNA im olfaktorischen System nach *in-situ*-Hybridisierung war jedoch eindeutig nicht spezifisch für die untersuchte Rezeptorspezifität mOR37B (Abb. 3.15). Es zeigte sich sowohl embryonal (E16) als auch früh-postnatal (P7) eine starke und ubiquitäre Expression von *Tmsb10* im OE, VNO sowie im OB, wobei im OE eine Beschränkung der Expression auf die Epithelbereiche erkennbar war, in denen primär unreife OSNs lokalisiert sind (Abb. 3.15 C+C'). Die Reduktion der Expressionszone von *Tmsb10* von mittleren zu mehr basalen Zellschichten mit fortschreitender Entwicklung spricht deutlich für eine Rolle von *Tmsb10* in unreifen Neuronen des olfaktorischen Systems verknüpft mit proliferativen, migratorischen und Neuritenelongationsprozessen. Daten, die eine Beteiligung von  $\beta$ -Thymosinen bei der Progression und Metastasierung verschiedenster Tumoren zeigen, untermauern diese Thesen zusätzlich, da sich vor allem metastasierende Tumorzellen in einem dedifferenzierten, quasi unreifen Zustand befinden (Weterman et al., 1993; Verghese-Nikolakaki et al., 1996; Santelli et al., 1999). Ursachen dafür, dass *Tmsb10* im doppelt-differentiellen Screening dennoch als positiv, d.h. mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifisch identifiziert wurde, könnten möglicherweise in einer nicht 100-prozentigen Subtraktion aller, mit anderen unreifen ORNs (Zelltyp X) als der mOR37B-Rezeptorspezifität assoziierter Transkripte begründet sein. Die plausibelste Erklärung hierfür wäre eine von anterior nach posterior im Epithel abnehmende Expressionsstärke von *Tmsb10* zum Zeitpunkt der Einzelzellgewinnung, da die Neuronen vom ORX-Typ zum überwiegenden Teil aus mehr posterioren OE-Bereichen isoliert wurden (siehe Abb. 3.11 A). Eine eindeutige A/P-Differentialität der *Tmsb10*-Expression an P7 konnte jedoch nicht festgestellt werden, sodass möglicherweise unterschiedliche Sensitivitäten der I- bzw. X-Pool-cDNA-Sonden ursächlich hierfür sind.

#### **4.2.3 Das in späten unreifen OSNs transkribierte *Gng8* wird zwar differenziell aber nicht mOR37B-spezifisch exprimiert**

Deutlich stärker repräsentiert unter den als differenziell identifizierten, in mOR37B-exprimierten Transkripten war *Gng8* (G-Protein gamma-UE 8) mit knapp 6 %. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten, wobei die G $\beta$ - und G $\gamma$ -Untereinheit zusammen mit der inhibitorischen G $\alpha$ -Untereinheit die

Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) vermitteln. Von *Gng8* ist bekannt, dass es ausschließlich in Neuronen des olfaktorischen Systems (OE, VNO, OB) exprimiert wird. Im OE zeigt *Gng8* eine mit dem Verlauf der Neurogenese ansteigende Expression mit einem Maximum kurz nach der Geburt - gleichzeitig der Zeitpunkt des größten Neuronenzuwachses während der olfaktorischen Neurogenese. Das *Gng8*-Signal ist dabei primär in den mittleren bis basalen Schichten des OE mit den unreifen OSNs lokalisiert. Im vomeronasalen Neuroepithel wurde das Maximum an *Gng8*-Signal ebenfalls in unreifen VRNs beobachtet (Ryba und Tirindelli, 1995). Die Untersuchung der *Gng8*-Expression mit DIG-markierten antisense-RNA-Sonden gegen die in der vorliegenden Arbeit identifizierte *Gng8*-Sequenz, durchgeführt an Gefrierschnitten der embryonalen (E16) und früh-postnatalen (P7) Nase (Abb. 3.16), bestätigten die Befunde von Ryba & Tirindelli aus der Ratte. Die *Gng8*-Expression in der mittleren Schicht des Riechepithels und den Glomeruli an P7 ist signifikant und bedeutet, dass das Signal in den sich gerade verdrahtenden OSNs lokalisiert ist. Es wird zwar somit exakt zum erwarteten Zeitpunkt, aber nicht spezifisch in unreifen mOR37B-OSNs exprimiert. Andererseits fielen jedoch einzelne, stark *Gng8*-positive OSNs im embryonalen OE und VNO auf (Abb. 3.16 C'+E'), die möglicherweise für eine differenzielle Expression in unreifen OSNs einer oder mehrerer Rezeptorspezifitäten sprechen.

Das Ausmaß der *Gng8*-Expression im OB zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten spiegelt im Gegensatz zur Literatur nicht die Expression im OE wider. In Rattenembryonen konnten die axonalen Fortsätze *Gng8*-positiver Neuronen an der Oberfläche des sich entwickelnden OB beobachtet werden noch bevor einzelne Glomeruli ausgebildet waren (Tirindelli und Ryba, 1996). Die hier durchgeführten ISHs zeigten dagegen kein *Gng8*-Signal im embryonalen OB an E16 (Abb. 3.16 D'). Axonale RNA-Signale sind aber generell schwer zu detektieren, sodass Markierungen in den Glomeruli hauptsächlich wegen der starken axonalen Konvergenz sichtbar werden und hier aufgrund relativ schwacher Signale höchstwahrscheinlich ein Problem der Färbungsintensität vorliegt. Die von Tirindelli & Ryba beschriebene früh-postnatale homogene Markierung der externen Faserschicht und einiger bereits ausgebildeter Glomeruli durch *Gng8* konnte wiederum bestätigt werden (Abb. 3.16 D). Es wurde gezeigt, dass sowohl im OE als auch im OB das *Gng8*-Signal mit zunehmender neuronaler Differenzierung schwächer und ungleichmäßiger wird, was auf eine im Adultus in begrenzten neurogenen Nischen stattfindende Regeneration hinweist (Tirindelli und Ryba, 1996). Die hier gezeigten Expressionsdaten für *Gng8* untermauern die in der Literatur beschriebenen Daten für eine konkrete Beteiligung von *Gng8* an der Entwicklung und Differenzierung olfaktorischer und vomeronasaler Rezeptorneuronen sowie an deren Regeneration. Jedoch muss auch für das *Gng8*-Transkript festgestellt werden, dass es zwar in Bezug auf seine Expressionsstärke in einzelnen OSNs

differenziell exprimiert wird, aber keine mOR37B-Selektivität aufweist. Somit muss auch *Gng8* aus den bereits erörterten Gründen (siehe 4.2) zu den aus dem Bibliothek-Screening resultierenden, falsch-positiven, Klonen gezählt werden. Quantitative Unterschiede in der *Gng8*-Expression entlang der anterior-posterioren Achse des Riechepithels kommen hier ebenfalls nicht als Ursache in Frage. Aufgrund der deutlich ungleichmäßigeren, differenziellen Verteilung des Signals im OE könnten dagegen zufällig einige schwach *Gng8*-positive OSNs vom X-Typ isoliert und für das Screening ausgewählt worden sein und damit ursächlich für die Nicht-mOR37B<sub>unreif</sub>-Selektivität sein.

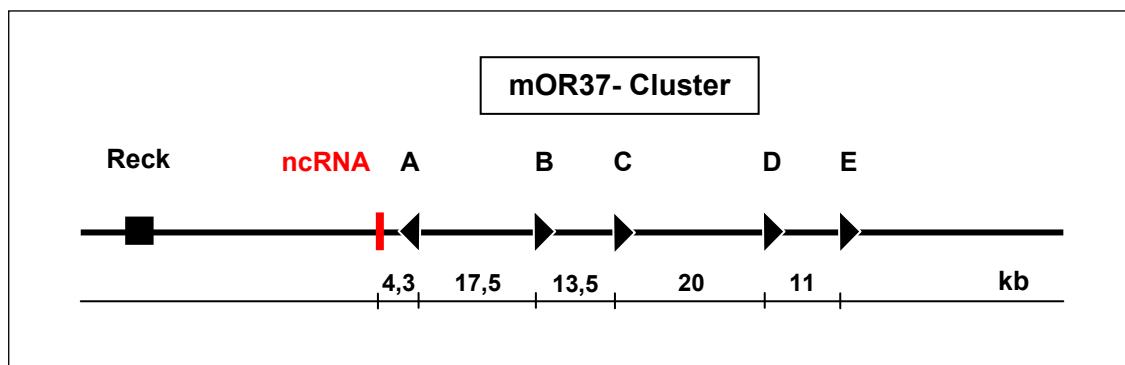
### **4.3 Das *ncRNA*-Transkript zeigt eine hoch selektive und vom Differenzierungsgrad abhängige Expression in mOR37B-Neuronen**

#### **4.3.1 Mögliche Funktionen der mOR37-assoziierten *ncRNA* auf der Basis erster bioinformatischer Daten**

Hochdurchsatz-Transkriptomanalysen liefern in der Regel Datensätze mit einem hohen Anteil an Sequenzen unbekannter Funktion. Diverse bioinformatische Analyse-Methoden stehen für die anschließende strukturelle und funktionelle Charakterisierung unbekannter Transkripte zur Verfügung. Als erster Schritt der bioinformatischen Charakterisierung der in dieser Arbeit identifizierten mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierten *ncRNA*-Sequenz wurde zunächst ein multiples Alignment der 167 aus dem doppelt-differenziellen Screening resultierenden *ncRNA*-Sequenzen mit dem Programm ClustalX durchgeführt. Diese Analyse bestätigte die poly(A)-RNA-Identität der *ncRNA*, die zum einen an der Vollständigkeit aller *ncRNA*-Sequenzen am 3'-Ende im Vergleich zum 5'-Sequenzbereich und zum anderen an der im 3'-Bereich enthaltenen poly(A)-Signalsequenz AATAAA zu erkennen ist. Poly(A)-Signalsequenzen liegen typischerweise 10-30 Nukleotide in 5'-Richtung der Polyadenylierung (Proudfoot und Brownlee, 1976), im Fall der *ncRNA* sind es 20 Nukleotide (Abb.1, Anhang IV, zusätzliche Daten). Die angewandte RT-PCR-Technik beruht schließlich darauf, dass die Erststrang-cDNA-Synthese durch Bindung des SR-T<sub>24</sub>-Primers an die am 3'-Ende von mRNA- oder anderen poly(A)-Transkripten befindliche poly(A)-Sequenz initiiert wird und somit ausschließlich die poly(A)-RNAs des Einzelzell-Transkriptoms im anschließenden Screening der cDNA-Bibliothek analysiert werden. Die längste hier gefundene *ncRNA*-Sequenz umfasste 377 bp. Rückschlüsse auf das wirkliche 5'-Ende sind bisher allerdings nicht möglich, da selbiges mittels 5'-RACE, einer Methode zur schnellen Amplifizierung von cDNA-Enden in 5'-Richtung der zugrunde liegenden *ncRNA*-Sequenz, erst noch identifiziert werden muss. Erste, vorläufige Untersuchungen zur genaueren Identifizierung des vorliegenden RNA-Typs zeigten weder die für

kodierende mRNAs charakteristischen Exon-Intron-Strukturen noch offene Leseraster (ORFs). Hierfür wurden die entsprechenden zur Verfügung stehenden Programme der Maus-Genom-Datenbank (MGD, <http://www.informatics.jax.org>) genutzt. Charakteristische Sekundärstrukturmerkmale von miRNAs, einer Klasse kleiner nicht-kodierender regulatorischer RNAs, konnten ebenfalls nicht identifiziert werden (vorläufige Daten, nicht gezeigt).

Zur Identifizierung der genomischen Lokalisation der *ncRNA* wurde mit dem megaBLAST-Programm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ein Abgleich der *ncRNA*-Sequenz mit den in der NCBI-Genbank annotierten Sequenzen des Mausgenoms vorgenommen. Hierbei fällt auf, dass die für die *ncRNA* kodierende Sequenz signifikanterweise auf Chromosom 4 circa 4,3 kb *upstream*, d.h. in 5'-Richtung des mOR37A-Rezeptors und damit in unmittelbarer Nähe des untersuchten Geruchsrezeptorgens mOR37B kartiert. Beide Rezeptoren, mOR37A und mOR37B, sind zusammen mit drei weiteren hoch homologen mOR37-Rezeptoren im mOR37-Gencluster I organisiert (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Genomische Kartierung der *ncRNA* unbekannter Funktion auf Chromosom 4.** Die *ncRNA*-Sequenz ist ca. 4,3 kb *upstream* von der CDS des mOR37A-Geruchsrezeptors und damit direkt vor dem mOR37-Gencluster I im Mausgenom lokalisiert. *Reck* (reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs) markiert das nächste *upstream* der *ncRNA*-Sequenz gelegene Gen/Transkript.

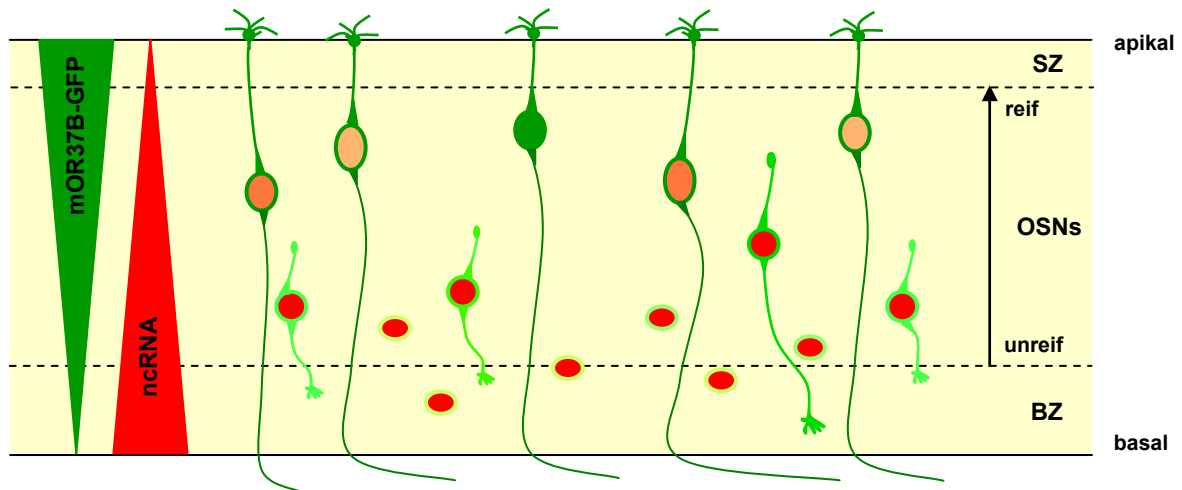
Diese genomische Lokalisation ist mit den bereits für andere ncRNAs beschriebenen Positionen in unmittelbarer Nähe des von ihnen regulierten Genclusters vergleichbar (Sleutels et al., 2002; Kohtz und Fishell, 2004; Feng et al., 2006; Nagano et al., 2008). Sie liefert zudem einen *proof-of-principle* der gesamten Screening-Strategie, da die Wahrscheinlichkeit, zufällig ein direkt neben dem untersuchten mOR37B-Gen lokalisiertes Transkript zu identifizieren bei geschätzten 20.000 Transkripten pro Zelle sehr klein ist. Signifikante Homologien auf Sequenzebene z.B. zu einer mRNA oder anderen nicht-kodierenden RNA bekannter oder noch unbekannter Funktion konnten für die *ncRNA*-Sequenz bisher nicht gefunden werden. MegaBLAST-Analysen sind zudem für RNA-Homologievergleiche nicht ausreichend. Aussagen über die Homologie sollten bei RNA generell über relativ aufwändige Sekundärstruktur-Analysen erfolgen, sodass hier eindeutig von vorläufigen Resultaten gesprochen werden muss.



#### 4.3.2 Selektive Expression der mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierten ncRNA in mOR37B-exprimierenden Neuronen

Entgegen möglichen Erwartungen lieferte das differenzielle Screening bislang keine Lenkungsmoleküle *per se*, sondern führte zur Identifizierung einer bisher völlig unbekannten, nicht-kodierenden RNA (ncRNA). Diese ncRNA kartiert signifikanterweise genomisch in unmittelbarer Nähe des untersuchten Geruchsrezeptorgens *mOR37B* vor dem mOR37-Gencluster I auf Chromosom 4 (siehe Abb. 4.1).

*In-situ*-Hybridisierungen mit antisense-RNA-Sonden gegen diese ncRNA-Sequenz bestätigten zunächst einmal, dass es sich bei der identifizierten Sequenz tatsächlich um ein real in olfaktorischen Neuronen exprimiertes Transkript handelt (siehe Abb. 3.17 und Abb. 3.18), welches weder im *Bulbus olfactorius* noch in Neuronen des Vomeronasalorgans nachzuweisen war. Die ncRNA-Expression ist dabei auf OSNs der mOR37-Rezeptorspezifität, die in einem klar definierten Bereich der mittleren Turbinalie im Riechepithel vorkommen (s. Abb. 3.11), beschränkt und somit extrem selektiv. Dabei fällt im früh-postnatalen OE (P7) ein deutlicher Expressionsgradient der ncRNA von stark in basal lokalisierten, vorwiegend unreifen mOR37B-positiven OSNs nach schwach in apikal liegenden, ausdifferenzierten OSNs mit Apikaldendrit und Zilien auf (Abb. 3.17). Dieser überaus interessante Befund deutet auf eine vom Differenzierungsgrad des jeweiligen OSNs abhängige Expression der ncRNA hin. Zusätzlich konnte durch die Kombination von *in-situ*-Hybridisierung mit antisense-Ribosonden gegen die ncRNA und einer anti-EGFP-Immunmarkierung zweifelsfrei die Co-Lokalisation des eindeutig cytoplasmatischen bzw. perinukleären ncRNA-Signals (siehe Abb. 3.17 C) mit dem in Axon, Apikaldendrit und Zilien mOR37B-positiver OSNs exprimierten EGFP-Marker festgestellt werden. Eine mögliche nukleäre Lokalisation des ncRNA-Transkriptes kann basierend auf den vorliegenden ISH-Daten nicht eindeutig geklärt werden. Abb. 4.2 fasst die aus der Expressionsanalyse resultierenden Daten für das ncRNA-Transkript und die EGFP-exprimierenden mOR37B-OSNs schematisch zusammen.



**Abb. 4.2: Zusammenfassendes Schema der Expressionsanalyse der mOR37-assoziierten ncRNA *in situ*.** Das ncRNA-Transkript wird im sich entwickelnden OE in einem absteigenden Gradienten von basal nach apikal entsprechend dem zunehmendem Differenzierungsgrad der OSNs exprimiert. Die Expression von EGFP ist dagegen deutlich stärker und häufiger in apikal gelegenen mOR37B-OSNs und meist schwächer in mehr basal im Epithel lokalisierten mOR37B-OSNs.

Neben der deutlichen Überzahl an ncRNA<sup>+</sup>/EGFP<sup>+</sup>-OSNs, die nach visueller Abschätzung bei weit über 90 % aller markierten OSNs liegt, wurden aber auch vereinzelt ncRNA<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup>-OSNs und sehr selten scheinbar ncRNA<sup>+</sup>/EGFP<sup>-</sup>-OSNs mit sehr schwachem EGFP-Signal beobachtet. Für die wenigen im Altersstadium E16 identifizierten EGFP-positiven mOR37B-OSNs lag die Co-Lokalisationsrate mit der ncRNA sogar bei 100 % (siehe Abb. 3.18). Der Unterschied in der Co-Lokalisationsrate zwischen postnatalem und embryonalem Riechepithel bestätigt, dass reife OSNs aufhören, das ncRNA-Transkript zu produzieren und erklärt somit das Vorkommen ncRNA<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup>-Zellen. Zudem gibt es für den zeitlichen Verlauf der OR-Expression Hinweise, dass unreife OSNs deutlich weniger Rezeptorprotein exprimieren im Vergleich zu reiferen, mehr differenzierten oder adulten, ausdifferenzierten OSNs (Iwema und Schwob, 2003), was eine mögliche Erklärung für das Auftreten einzelner, „scheinbar“ ncRNA<sup>+</sup>/EGFP<sup>-</sup>-OSNs sein könnte. In den meisten dieser Fälle wird jedoch ein sehr schwaches von einem sehr starken Signal überlagert, so dass eine Co-Lokalisation kaum oder nicht zweifelsfrei detektierbar ist. Bisher existiert keine Literatur, die eine derart hoch selektive, geruchsrezeptor-assoziierte Expression einer langen ncRNA in sich entwickelnden OSNs zeigt.

#### 4.3.3 Mögliche Bedeutung von nicht-kodierenden RNAs bei der Regulation neuroentwicklungsbiologischer Prozesse im olfaktorischen System

Bereits vor Jahrzehnten erkannten Jacob & Monod das regulatorische Potential von RNA, was auf ihrer Fähigkeit beruht, reversibel an nahezu alle RNA- und DNA-Moleküle über vollständige oder partielle Komplementarität ihrer Nukleotidsequenz zu binden (Jacob und Monod, 1961; Britten und Davidson, 1969). Seither wurde eine Vielzahl an RNA-basierten

Regulationssystemen charakterisiert (Willingham und Gingeras, 2006) und diverse Klassen regulatorischer RNA-Spezies in Viren, Pilzen, Pflanzen bis hin zu Säugern beschrieben (Mattick und Makunin, 2005; Storz et al., 2005; Zamore und Haley, 2005; Goodrich und Kugel, 2006; Gupta et al., 2006; Mattick und Makunin, 2006). Die RNA-Funktionen sind dabei so vielfältig wie die Kontrolle von RNA-Stabilität, Genexpression, Entwicklung und Differenzierung von Zellen und Geweben, RNA-Modifizierung, Chromatin-Organisation, alternativem Spleißen, subzellulärer Protein-Lokalisation und vieler weiterer Prozesse (Willingham und Gingeras, 2006). Eine aktuelle Studie von Mercer et al. konnte zeigen, dass nahezu die Hälfte von über 1.300 analysierten ncRNAs distinkte Expressionsmuster in verschiedenen Regionen des Maushirns aufweisen, darunter in einzelnen Subregionen von Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und *Bulbus olfactorius* (Mercer et al., 2008). Die *Gomafu* ncRNA beispielsweise zeigt im *Bulbus olfactorius* eine kernspezifische Expression in Neuronen der Mitralzellschicht, die mit *Dlx2* interagierende ncRNA *Evf-2* weist dagegen eine gleichzeitige Expression im rostralen migratorischen Strom (RMS) und im *Bulbus olfactorius* auf. Im Fall der *Dlx*-Homöobox-Gene ist der genaue Wirkmechanismus der *Evf-2*-regulierten Aktivierung der *Dlx5*- und *Dlx6*-Transkription detailliert beschrieben (Kohtz und Fishell, 2004; Feng et al., 2006). *Dlx*-Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Differenzierung der Basalganglien sowie für die Entwicklung der in den dortigen proliferativen Zonen gebildeten GABAergen und OB-Interneuronen (Anderson et al., 1997a; Anderson et al., 1997b). *Dlx5* wird bereits während der frühen Entwicklung des olfaktorischen Systems in OSNs exprimiert und scheint die Konnektivität auswachsender Neuronen zell-autonom zu steuern (Long et al., 2003; Long et al., 2007; Merlo et al., 2007). Für eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren (*Fez1* (Hirata et al., 2006), *Lhx2* (Hirota und Mombaerts, 2004), *Arx* (Yoshihara et al., 2005)) konnte eine wichtige Rolle bei der korrekten Entwicklung und Verdrahtung von OSNs in der Maus bereits nachgewiesen werden. Womöglich werden auch diese Gene in ihrer Aktivität durch ncRNAs reguliert.

Die hier beschriebenen bioinformatischen und expressionsanalytischen Fakten zusammen implizieren, dass die als mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifisch exprimiert identifizierte und als nicht-kodierend bezeichnete RNA eine andere als die klassische mRNA-Funktion haben muss. Über ihre Funktion kann bisher jedoch nur spekuliert werden. Man könnte sich die ncRNA als ein Signal vorstellen, welches vom transkriptionell aktivierten OR-Locus ausgeht und für die Unterdrückung kompetierender Loci oder auch für die Aktivierung anderer, assoziierter Loci verantwortlich ist. Hier wären z.B. Lenkungsrezeptorgene oder deren *upstream* liegende Transkriptionsfaktoren gute Kandidatenregionen, so wie bei der Regulation von *Dlx5*. Hier bewirkt beispielsweise die ncRNA *Evf-2* in Kooperation mit *Dlx2* eine erhöhte transkriptionelle Aktivität der *Dlx5/6*-Enhancerregion, die daraufhin zur Expression der

Homöoboxgene *Dlx5* und *Dlx6* führt. Ähnlich könnte man sich die Ankopplung der Expression eines mOR37B-spezifischen Lenkungsgens vorstellen.

Für einige ncRNAs wie z.B. für die *Airn*-ncRNA (Sleutels et al., 2002; Nagano et al., 2008) oder die *Evf-1/2*-ncRNAs (Kohtz und Fishell, 2004; Feng et al., 2006) wurden Funktionen bei der Steuerung der monoallelischen Expression von in genomischen Clustern organisierten Genen - was auch für die Geruchsrezeptorgene zutrifft - beschrieben. Die für die doppelt-differenzielle Transkriptomanalyse verwendeten OSNs wurden jedoch zu einem Zeitpunkt isoliert, an dem die Selektion und erfolgreiche Expression des mOR37B-Gens bereits erfolgt war. Eine genregulatorische Rolle, wobei die *ncRNA* an der Selektion und monoallelischen Expression dieses Geruchsrezeptorgens aus dem mOR37-Cluster I beteiligt wäre, kommt daher eher nicht in Frage. Denkbar wäre aber eine Funktion der *ncRNA* bei der Stabilisierung der Rezeptorexpression, möglicherweise über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Unterdrückung der Expression eines anderen Rezeptortyps, bis die korrekte Verdrahtung des betreffenden OSN abgeschlossen ist.

Überraschenderweise gehört keines der fünf identifizierten Transkripte wie vielleicht erwartet zur Gruppe neuronaler Lenkungsmoleküle. Nach der Annahme, dass sich auswachsende OSNs verschiedener OR-Spezifitäten primär in ihrem Lenkungsapparat unterscheiden müssen, sollten sich nach vollständiger Subtraktion der entsprechenden Transkripte mOR37B-spezifische Lenkungsmoleküle identifizieren lassen. Grundsätzlich können solche Lenkungsmoleküle nur gefunden werden, wenn sie zwischen mOR37B<sub>unreif</sub> und ORX<sub>unreif</sub> qualitativ unterschiedlich sind, wenn sie dagegen nur quantitative Unterschiede aufweisen, werden sie eventuell subtrahiert. Die hier vorgestellten Daten wären also mit der Existenz eines qualitativ einheitlichen und nur auf quantitativen Unterschieden der Lenkungsmoleküle beruhenden Lenkungsmechanismus im olfaktorischen System (vergleichbar der Gradientenlenkung bei topographischen Projektionen) vereinbar. Es wäre denkbar, dass der Vermittler zwischen Rezeptorspezifität und Menge von universellen Lenkungsrezeptoren die gefundene *ncRNA* ist. Des Weiteren könnte es aber auch sein, dass Lenkungsmoleküle mit der hier verfolgten Screening-Strategie noch nicht gefunden wurden, weil ihre Abundanz doch etwas geringer ist als ursprünglich angenommen. Ein variabler Expressionsgrad desselben Lenkungsmoleküls in OSNs unterschiedlicher Rezeptorspezifität sowie eine sehr geringe Abundanz könnten demnach die Ursache dafür sein, dass die für mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen Lenkungsmoleküle möglicherweise „wegsubtrahiert“ wurden während des differenziellen Screenings.

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Auf der Suche nach spezifitätsabhängig exprimierten Differenzierungsmolekülen in sich entwickelnden Neuronen des olfaktorischen Systems der Maus konnte in der vorliegenden Arbeit durch doppelt-differenzielle Analyse von 3'-cDNA-*Tag*-Bibliotheken einzelner OSNs der Rezeptorspezifität mOR37B eine nicht-kodierende RNA bisher unbekannter Funktion identifiziert werden. Das *ncRNA*-Transkript ist selektiv in mOR37B-Neuronen abhängig vom Differenzierungsgrad exprimiert und könnte eine Schlüsselfunktion bei der regulatorischen Ankopplung der Expression mOR37B-assoziiierter Lenkungs- und Differenzierungsmoleküle haben. Dieser überaus interessante Befund könnte auf einen für das olfaktorische System ganz neuen, über ncRNAs regulierten und an der Entstehung der spezifitätsabhängigen olfaktorischen Projektion beteiligten Mechanismus hinweisen.

In einem ersten Ansatz zukünftiger Arbeiten sollte mittels 5'-RACE zunächst die vollständige Sequenz des bislang identifizierten 3'-ncRNA-Fragmentes synthetisiert werden. Im Anschluss muss die Sequenz der mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierten *ncRNA* mit geeigneten bioinformatischen Analyseverfahren in Bezug auf ihre genomische Struktur (Erkennungssequenzen für Transkriptionsinitiation und -stop), konservierte Motive, Sekundärstrukturmerkmale sowie Homologien zu anderen, bereits bekannten ncRNAs oder ncRNA-Familien näher charakterisiert werden. Hierfür steht eine Reihe frei zugänglicher Algorithmen und Programme zur Verfügung (Machado-Lima et al., 2008). Des Weiteren wäre interessant zu wissen, ob andere olfaktorische Gencluster vergleichbare ncRNAs enthalten und somit auf eine mögliche gleichartige Genregulation hindeuten. Die so gewonnenen Informationen sollten bereits Hinweise auf mögliche Funktionen der mOR37B<sub>unreif</sub>-assoziierten ncRNA liefern, die in einem weiteren Ansatz durch Generierung und Analyse einer transgenen knockout-Mauslinie *in vivo* überprüft werden sollten. Diese Strategie ist durch Verwendung des für die Herstellung der *mOR37A-EGFP*-transgenen Mauslinie eingesetzten *Targeting*-Konstruktes (Strotmann et al., 2000) nach Deletion des hierin eventuell bereits enthaltenen ncRNA-Gens zügig durchführbar. Final sollte der erzeugte ncRNA<sup>-/-</sup>-Phänotyp histologisch mittels Immunhistochemie und *in-situ*-Hybridisierung auf Veränderungen in der olfaktorischen Projektion hin analysiert werden. Dies wird erleichtert, da durch das *Targeting*-Konstrukt für eine spezifische Markierung der untersuchten Sinneszell-Subpopulation und deren Axonen durch EGFP gesorgt ist. Zu erwartende Defekte wären z.B. ein fehlerhaftes glomeruläres Targeting der mOR37B-Axone bzw. von Axonen des mOR37-Genclusters I oder im Falle einer genregulatorischen Funktion der *ncRNA* die quantitative Reduktion der Expression von Rezeptoren des mOR37-Genclusters in OSNs der mOR37-Subfamilie entsprechenden zentralen Region im OE.

---

Erst eine funktionelle Charakterisierung des durch den aufwändigen Screen gefundenen neuartigen, nicht-kodierenden Transkripts wird qualitative und eindeutige Aussagen über die funktionelle Relevanz der Ergebnisse ermöglichen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das olfaktorische System ist ein sehr gut geeignetes Modellsystem zur Analyse der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen von neuronaler Entwicklung und Differenzierung. Das Säugergenom umfasst ~ 1200 Gene für die zur Superfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren gehörenden Geruchsrezeptoren. Während der Entwicklung wählt jedes olfaktorische sensorische Neuron (OSNs) stochastisch nur *ein* bestimmtes Geruchsrezeptorgen zur Expression aus, wodurch die Spezifität des jeweiligen OSNs definiert wird. Dabei sind OSNs, die das gleiche Rezeptorgen exprimieren, zufällig auf der Sinnesoberfläche des Riechepithels verteilt. Die Verarbeitung olfaktorischer Information beruht nun darauf, dass die Axone von OSNs gleicher Rezeptorspezifität in einem oder wenigen charakteristischen und inter-individuell stereotypen Punkten (Glomeruli) auf dem *Bulbus olfactorius* konvergieren und somit eine nicht-topographische, spezifitätsabhängige Karte erzeugen. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, wie diese bemerkenswerte Spezifität erreicht wird. Im Hinblick auf dieses „Verdrahtungsproblem“ konnte gezeigt werden, dass das Geruchsrezeptorprotein selbst nur zum Teil zur Etablierung dieser Karte beiträgt, indem es über homophile Axon-Axon-Interaktion die Sortierung und Konvergenz olfaktorischer Axone vermittelt. Der Austausch eines Rezeptorgens an einem bestimmten Locus führte zwar zur Umlenkung der Axonterminalien der betreffenden OSNs, aber nicht zur Konvergenz der Axone in dem für den transgenen Rezeptor spezifischen Zielgebiet (Mombaerts et al., 1996). Folglich sind zusätzlich zum OR noch weitere Signalmoleküle für die axonale Lenkung zum glomerulären Zielgebiet erforderlich. Evidenzen für eine, die korrekte Verdrahtung olfaktorischer Axone unterstützende Funktion gibt es für klassische axonale Lenkungsmoleküle wie die Ephrine oder Adhäsionsmoleküle wie *Kirrel 2/3* (Cutforth et al., 2003; Serizawa et al., 2006). Auch aktivitätsabhängige Prozesse werden in diesem Kontext diskutiert (Imai et al., 2006). Die molekulare Identität eindeutig geruchsrezeptor-assoziiierter „Verdrahtungsmoleküle“ ist bisher jedoch noch ungeklärt.

Da Sinneszellen verschiedener Rezeptorspezifität an verschiedene Zielorte projizieren, müssen sie sich in ihrem Lenkungsapparat qualitativ oder quantitativ unterscheiden. Wenn der die Spezifität bestimmende Geruchsrezeptor -wie beschrieben- nicht gleichzeitig als Axonlenkungsrezeptor fungiert, könnte ein mit jedem Geruchsrezeptorphänotyp koexprimierter, spezifischer Lenkungsapparat eine Lösung für das olfaktorische „Verdrahtungsproblem“ darstellen. Jedenfalls gehört die Lenkung damit — möglicherweise als deren wichtigster Vertreter — zu einer Klasse von Prozessen, die mit „Geruchsrezeptorphänotyp-abhängige Differenzierungsprozesse“ überschrieben werden können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, differenziell exprimierte und in diese Prozesse involvierte Gene durch Vergleich der Transkriptionsprofile einzelner reifer mit unreifen

OSNs derselben Spezifität bei gleichzeitiger Subtraktion genereller Unreifemarker zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden von einzelnen unreifen olfaktorischen Neuronen, die den Geruchsrezeptor mOR37B zusammen mit transgenem EGFP exprimieren (Strotmann et al., 2000), 3'-cDNA-Tag-Bibliotheken durch globale reverse Transkription und PCR-Amplifikation (RT-PCR) der Einzelzell-Transkriptome hergestellt (Dulac und Axel, 1995; Iscove et al., 2002). Die Bibliotheken wurden anschließend durch subtraktives Screening mit komplexen Sonden, die die Einzelzell-Transkriptome von reifen mOR37B-Neuronen (OR M) und unreifen Neuronen anderer Spezifitäten (OR X) repräsentieren, analysiert. Mit dieser doppelt-differenziellen Strategie war es möglich, das mOR37B-assoziierte Transkriptom nach mOR37B<sub>unreif</sub>-spezifischen Transkripten zu filtern. Durch intensive Optimierung jedes einzelnen Schrittes dieser anspruchsvollen Methode wurde sichergestellt, dass die Einzelzell-Transkriptome hocheffizient amplifiziert wurden und es nicht zu Verzerrungen in der Transkript-Repräsentation der stark amplifizierten 3'-cDNA-Tags kam. Zudem wurde gezeigt, dass das amplifizierte cDNA-Material erschöpfend und frei von Artefakten kloniert werden konnte und eine hochsensitive Detektion bei der finalen differenziellen Hybridisierung erreicht wurde. Auf diese Weise wurde eine zuverlässige Methode zum Vergleich von Einzelzell-Transkriptomen ausgearbeitet, die auch für viele andere Probleme der Zelldifferenzierung anwendbar ist.

Der Großteil der im Screening identifizierten Transkripte entfiel auf eine neue nicht-kodierende RNA (*ncRNA*), die ausschließlich in unreifen Neuronen der mOR37B-Rezeptorspezifität exprimiert wird, wie Doppelmarkierungen mit *in-situ*-Hybridisierung und EGFP-Immunfärbung zeigen. Die *ncRNA* kartiert signifikanterweise genomisch auf Chromosom 4 unmittelbar *upstream* des mOR37B-Gens entsprechend der Spezifität der untersuchten Subpopulation olfaktorischer Neuronen. Vorläufige bioinformatische Daten sprechen für eine mRNA-ähnliche Struktur der *ncRNA* und liefern keine Hinweise für miRNA-typische Merkmale. Eine umfassende bioinformatische Analyse bedarf jedoch zunächst der Aufklärung der vollständigen Primärsequenz der neuartigen *ncRNA*. Die vorliegenden Daten lassen aber Spekulationen über mögliche Funktionen des mOR37B-assoziierten *ncRNA*-Transkriptes zu. Wie für *ncRNAs* bekannter Funktion beschrieben, könnte die gefundene *ncRNA* eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression anderer, in diesem Fall mOR37B-assoziiierter Gene spielen. Dies könnte u.a. die Stabilisierung der Geruchsrezeptorauswahl aus dem mOR37-Cluster I in individuellen OSNs durch Unterdrückung kompetierender OR-Loci oder die regulatorische Ankopplung der Expression mOR37-korrelierter Lenkungsmoleküle während der frühen Entwicklung des olfaktorischen Systems umfassen. In jedem Fall zeigen die vorliegenden Daten einen neuen regulatorischen Mechanismus bei der vom Geruchsrezeptor-Phänotyp abhängigen Differenzierung olfaktorischer sensorischer Neuronen unter Beteiligung von *ncRNAs*.



## 6. SUMMARY

The olfactory system is a particularly well-suited model system for analyzing the molecular mechanisms underlying neuronal development and differentiation. The genome of mammals comprises about 1200 genes for odorant receptors (ORs) belonging to the superfamily of G-protein coupled receptors. During differentiation, every individual olfactory sensory neuron (OSN) stochastically selects only one out of these genes for expression, thereby defining its functional specificity. OSNs expressing the same receptor gene are randomly scattered on the sensory surface of the olfactory epithelium in the nose. However, neural processing of olfactory information relies on the fact, that all OSNs of the same specificity converge their axons precisely to a single or very few characteristic and inter-individually stereotypic locations on the olfactory bulb (glomeruli), thus generating a highly non-topographic, receptotopic map. Up to now, it remains largely elusive, how this spectacular specificity is achieved. With respect to the wiring problem it has been shown that the establishment of this map is in part based on the OR protein itself, which seems to be critical for axon sorting and convergence mediated by homophilic interactions. Swapping of the receptor gene at a particular locus relocates the axonal terminations of the respective OSNs, but does not simply redirect them to the target specific for the new receptor (Mombaerts et al., 1996). This suggests that, in addition to the OR, other molecules are required for axon guidance to the glomerular target. There is some evidence for classical axon guidance cues like *ephrins* as well as for adhesion molecules like *Kirrel 2/3* (Cutforth et al., 2003; Serizawa et al., 2006) to support the correct wiring of olfactory axons. Activity-dependent processes are also discussed in this context (Imai et al., 2006). However, the molecular identity of definitive OR-associated wiring molecules has remained elusive.

Olfactory sensory neurons expressing different odorant receptors project their axons to different glomerular targets on the olfactory bulb. Therefore, they should differ either in the amount or the components of their respective guidance apparatus. Although the OR protein defines odorant specificity of a given olfactory sensory neuron, it doesn't act as a guidance receptor itself. A set of guidance molecules specifically coexpressed with each OR could be a solution to the olfactory wiring problem. Generally speaking, the guidance of OSN axons belongs to, and possibly is the most important member of a family of processes which might be termed „OR-phenotype-dependent differentiation“. The aim of the present study was to identify differentially expressed genes involved in this process by comparing the transcriptional profiles of single mature vs. immature OSNs of the same specificity and at the same time subtracting general markers of immaturity. Therefore, global reverse transcription and PCR amplification (RT-PCR) of single-cell transcriptomes was performed to generate 3'-cDNA-*tag* libraries of single immature olfactory neurons expressing olfactory

receptor mOR37B together with transgenic EGFP. Libraries were analyzed by subtractive screening with complex probes representing the single-cell transcriptomes of mature (OR M) and immature neurons of other specificities (OR X). Using this double-differential approach, it was possible to filter the mOR37B-associated transcriptome for mOR37B<sub>immature</sub>-specific transcripts. Extensive optimization of each individual step of the challenging technique ensured that single-cell transcriptomes were amplified with high efficiency and that there was no bias in transcript representation of highly amplified 3'-cDNA-tags. Furthermore, it could be confirmed that the cloning of the amplified cDNA material was complete and free of artefacts and that a high detection sensitivity during the final differential hybridization procedure was achieved. In this way, a reliable method was developed for the accurate comparison of single-cell transcriptomes, which is applicable for a variety of questions in cellular differentiation.

The major transcript found in the screen was a novel non-coding RNA (*ncRNA*), which turns out to be expressed exclusively in the sparse population of immature neurons expressing the mOR37B-receptor as shown by double-labeling with *in situ* hybridization and EGFP-immunolabeling. Intriguingly, the gene of this *ncRNA* genomically maps to chromosome 4 immediately upstream of the mOR37B gene defining the specificity of the analyzed subpopulation of neurons. Preliminary bioinformatic data suggest a mRNA-like structure for the found *ncRNA* transcript and show no evidence for micro-RNA features. Nevertheless, thorough bioinformatic analysis has to await elucidation of the full-length primary sequence of the novel *ncRNA*. Data prompt speculations about the possible role of the identified mOR37B-associated *ncRNA* transcript. As shown for ncRNAs of known function, the found *ncRNA* could likely play an important role in regulating the expression of other, in this case mOR37B-associated genes. Functions might include the fixation of the OR gene choice out of cluster I of mOR37 genes in individual OSNs by suppressing competitive OR loci or the regulation of expression of mOR37B-associated guidance molecules during early development of the olfactory system. In any case, these data identify a novel regulatory mechanism in the OR-phenotype-dependent differentiation of OSNs crucially involving ncRNAs.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson S. A., Eisenstat D. D., Shi L., Rubenstein J. L. (1997a) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson S. A. et al. (1997b) Mutations of the homeobox genes Dlx-1 and Dlx-2 disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19:27-37.
- Arevian A. C., Kapoor V., Urban N. N. (2008) Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci* 11:80-87.
- Arlotta P. et al. (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45:207-221.
- Ausubel F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. A., Struhl, K. (1992ff) Current Protocols in Molecular Biology. New York: *John Wiley & Sons*.
- Bargmann C. I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282:2028-2033.
- Barnea G. et al. (2004) Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 304:1468.
- Baugh L. R., Hill A. A., Brown E. L., Hunter C. P. (2001) Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 29:E29.
- Benton R. (2006) On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cell Mol Life Sci* 63:1579-1585.
- Bertone P. et al. (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* 306:2242-2246.
- Bhandawat V., Reisert J., Yau K. W. (2005) Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science* 308:1931-1934.
- Biffo S. et al. (1990) B-50/GAP43 Expression Correlates with Process Outgrowth in the Embryonic Mouse Nervous System. *Eur J Neurosci* 2:487-499.
- Bozza T. et al. (2009) Mapping of class I and class II odorant receptors to glomerular domains by two distinct types of olfactory sensory neurons in the mouse. *Neuron* 61:220-233.
- Brady G., Iscove N. N. (1993) Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymol* 225:611-623.
- Breer H., Fleischer J., Strotmann J. (2006) The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci* 63:1465-1475.
- Britten R. J., Davidson E. H. (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 165:349-357.
- Broman I. (1921) Über die Entwicklung der konstanten grösseren Nasennebenhöhlendrüsen der Nagetiere. . *Z Anat Entwickl-Gesch* 60:439-586.

- Brown C. J. et al. (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349:38-44.
- Buck L., Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187.
- Carninci P. et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309:1559-1563.
- Carter L. A., MacDonald J. L., Roskams A. J. (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24:5670-5683.
- Cau E., Casarosa S., Guillemot F. (2002) Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 129:1871-1880.
- Cau E., Gradwohl G., Fode C., Guillemot F. (1997) Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124:1611-1621.
- Cawley S. et al. (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116:499-509.
- Cheng J. et al. (2005) Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308:1149-1154.
- Cheng T. et al. (1996) Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13158-13163.
- Cherepanov A. V., de Vries S. (2001) Binding of nucleotides by T4 DNA ligase and T4 RNA ligase: optical absorbance and fluorescence studies. *Biophys J* 81:3545-3559.
- Cherepanov A. V., de Vries S. (2002) Dynamic mechanism of nick recognition by DNA ligase. *Eur J Biochem* 269:5993-5999.
- Chess A., Simon I., Cedar H., Axel R. (1994) Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78:823-834.
- Chiang M. K., Melton D. A. (2003) Single-cell transcript analysis of pancreas development. *Dev Cell* 4:383-393.
- Choi P. S. et al. (2008) Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron* 57:41-55.
- Chomczynski P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201:134-139.
- Cloutier J. F. et al. (2002) Neuropilin-2 mediates axonal fasciculation, zonal segregation, but not axonal convergence, of primary accessory olfactory neurons. *Neuron* 33:877-892.
- Conzelmann S., Malun D., Breer H., Strotmann J. (2001) Brain targeting and glomerulus formation of two olfactory neuron populations expressing related receptor types. *Eur J Neurosci* 14:1623-1632.

- Costa F. F. (2007) Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene* 386:1-10.
- Cutforth T. et al. (2003) Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* 114:311-322.
- Deng G., Wu R. (1981) An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucleic Acids Res* 9:4173-4188.
- Dulac C., Axel R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206.
- Dulac C., Torello A. T. (2003) Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4:551-562.
- Eberwine J. et al. (1992) Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3010-3014.
- Elsaesser R., Montani G., Tirindelli R., Paysan J. (2005) Phosphatidyl-inositide signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. *Eur J Neurosci* 21:2692-2700.
- Farbman A. I., Margolis F. L. (1980) Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 74:205-215.
- Feinstein P., Mombaerts P. (2004) A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117:817-831.
- Feinstein P. et al. (2004) Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell* 117:833-846.
- Feng J. et al. (2006) The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev* 20:1470-1484.
- Firestein S. (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211-218.
- Flory P. J. (1936) Molecular Size Distribution in Linear Condensation Polymers. *Contibution No 164 from the Experiment Station of E I du Pont de Nemours & Company.*
- Freeman T. C., Lee K., Richardson P. J. (1999) Analysis of gene expression in single cells. *Curr Opin Biotechnol* 10:579-582.
- Fulle H. J. et al. (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3571-3575.
- Fuss S. H., Omura M., Mombaerts P. (2005) The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 22:2649-2654.
- Gierer A. (1998) Possible involvement of gradients in guidance of receptor cell axons towards their target position on the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 10:388-391.
- Glusman G., Yanai I., Rubin I., Lancet D. (2001) The complete human olfactory subgenome. *Genome Res* 11:685-702.
- Godfrey P. A., Malnic B., Buck L. B. (2004) The mouse olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2156-2161.

- Gogos J. A. et al. (2000) Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map. *Cell* 103:609-620.
- Goodrich J. A., Kugel J. F. (2006) Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:612-616.
- Graziadei P. P., Graziadei G. A. (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8:1-18.
- Graziadei P. P. C., Monti Graziadei G. A. (1978) Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. In: Handbook of Sensory Physiology (Jacobson M, ed), pp 55-82. Berlin: Springer.
- Grüneberg H. (1973) A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z Anat Entwicklungsgesch* 140:39-52.
- Gu J. et al. (1998) Purification and characterization of heterologously expressed mouse CYP2A5 and CYP2G1: role in metabolic activation of acetaminophen and 2,6-dichlorobenzonitrile in mouse olfactory mucosal microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 285:1287-1295.
- Guillemot F. et al. (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476.
- Gupta A. et al. (2006) Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* 442:82-85.
- Guttman M. et al. (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458:223-227.
- Hamilton B. A., Shulman L. Frequencies of Restriction Sites in Murine cDNA. *in* *Novations* 3.
- Hempstead J. L., Morgan J. I. (1983) Monoclonal antibodies to the rat olfactory sustentacular cell. *Brain Res* 288:289-295.
- Hinkle D. et al. (2004) Single neurons as experimental systems in molecular biology. *Prog Neurobiol* 72:129-142.
- Hirata T. et al. (2006) Zinc-finger gene Fez in the olfactory sensory neurons regulates development of the olfactory bulb non-cell-autonomously. *Development* 133:1433-1443.
- Hirota J., Mombaerts P. (2004) The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8751-8755.
- Hu J. et al. (2007) Detection of near-atmospheric concentrations of CO<sub>2</sub> by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* 317:953-957.
- Huff T. et al. (2001) beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 33:205-220.
- Imai T., Suzuki M., Sakano H. (2006) Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314:657-661.

- Iscove N. N. et al. (2002) Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. *Nat Biotechnol* 20:940-943.
- Ishii T. et al. (2001) Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes Cells* 6:71-78.
- Iwema C. L., Schwob J. E. (2003) Odorant receptor expression as a function of neuronal maturity in the adult rodent olfactory system. *J Comp Neurol* 459:209-222.
- Iwema C. L. et al. (2004) Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 24:356-369.
- Jacob F., Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-356.
- Jacob H. (1951) [On the histopathology of retrograde and transneuronal degeneration.]. *Dtsch Z Nervenheilkd* 166:146-165.
- Jacobson H., Stockmayer W. H. (1950) Intramolecular Reactions in Polycondensations. I. The Theory of Linear Systems. *The Journal of Chemical Physics* 18.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Neumann R., Keyte J. (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 16:10953-10971.
- Juilfs D. M. et al. (1997) A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3388-3395.
- Kaluza J. F. et al. (2004) Olfactory receptors in the mouse septal organ. *J Neurosci Res* 76:442-452.
- Kaneko-Goto T., Yoshihara S., Miyazaki H., Yoshihara Y. (2008) BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli. *Neuron* 57:834-846.
- Kapranov P., Willingham A. T., Gingeras T. R. (2007) Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nat Rev Genet* 8:413-423.
- Kapranov P. et al. (2002) Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science* 296:916-919.
- Kapranov P. et al. (2005) Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res* 15:987-997.
- Kawauchi S. et al. (2009) Foxg1 promotes olfactory neurogenesis by antagonizing Gdf11. *Development*.
- Kawauchi S. et al. (2004) Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. *Dev Neurosci* 26:166-180.
- Kawauchi S. et al. (2005) Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse. *Development* 132:5211-5223.
- Kay L. M. et al. (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci* 32:207-214.

- Kirn-Safran C. B., D'Souza S. S., Carson D. D. (2008) Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Semin Cell Dev Biol* 19:187-193.
- Kirn-Safran C. B. et al. (2002) Changes in the cytologic distribution of heparin/heparan sulfate interacting protein/ribosomal protein L29 (HIP/RPL29) during in vivo and in vitro mouse mammary epithelial cell expression and differentiation. *Dev Dyn* 223:70-84.
- Kirn-Safran C. B. et al. (2007) Global growth deficiencies in mice lacking the ribosomal protein HIP/RPL29. *Dev Dyn* 236:447-460.
- Klein C. A. et al. (2002) Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* 20:387-392.
- Kohtz J. D., Fishell G. (2004) Developmental regulation of EVF-1, a novel non-coding RNA transcribed upstream of the mouse *Dlx6* gene. *Gene Expr Patterns* 4:407-412.
- Lander E. S. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Latos P. A. et al. (2009) An in vitro ES cell imprinting model shows that imprinted expression of the *Igf2r* gene arises from an allele-specific expression bias. *Development* 136:437-448.
- Lee J. T., Davidow L. S., Warshawsky D. (1999) Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 21:400-404.
- Legerski R. J., Robberson D. L. (1985) Analysis and optimization of recombinant DNA joining reactions. *J Mol Biol* 181:297-312.
- Leinders-Zufall T. et al. (2007) Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14507-14512.
- Leung C. T., Coulombe P. A., Reed R. R. (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10:720-726.
- Liberles S. D., Buck L. B. (2006) A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442:645-650.
- Lin D. M. et al. (2000) Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* 26:69-80.
- Lin S. C., Morrison-Bogorad M. (1990) Developmental expression of mRNAs encoding thymosins beta 4 and beta 10 in rat brain and other tissues. *J Mol Neurosci* 2:35-44.
- Lomvardas S. et al. (2006) Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126:403-413.
- Long J. E. et al. (2003) DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system. *J Neurosci* 23:568-578.
- Long J. E. et al. (2007) Dlx-dependent and -independent regulation of olfactory bulb interneuron differentiation. *J Neurosci* 27:3230-3243.
- Lottspeich F., Zorbas, H. (2006) Bioanalytik, 2nd Edition: *Spektrum Akademischer Verlag*.



- Lowe G., Gold G. H. (1993) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366:283-286.
- Lugo D. I. et al. (1991) Developmental regulation of beta-thymosins in the rat central nervous system. *J Neurochem* 56:457-461.
- Machado-Lima A., del Portillo H. A., Durham A. M. (2008) Computational methods in noncoding RNA research. *J Math Biol* 56:15-49.
- Malnic B., Godfrey P. A., Buck L. B. (2004) The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2584-2589.
- Malun D., Brunjes P. C. (1996) Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *J Comp Neurol* 368:1-16.
- Mattick J. S., Makunin I. V. (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1:R121-132.
- Mattick J. S., Makunin I. V. (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1:R17-29.
- Mercer T. R. et al. (2008) Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:716-721.
- Merlo G. R. et al. (2007) The role of Dlx homeogenes in early development of the olfactory pathway. *J Mol Histol* 38:612-623.
- Mertz J. E., Davis R. W. (1972) Cleavage of DNA by R 1 restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:3370-3374.
- Meyer M. R. et al. (2000) A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10595-10600.
- Miller S. A., Brown A. J., Farach-Carson M. C., Kirn-Safran C. B. (2003) HIP/RPL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyte differentiation. *Differentiation* 71:322-336.
- Miyamichi K., Serizawa S., Kimura H. M., Sakano H. (2005) Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:3586-3592.
- Mombaerts P. (1999) Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286:707-711.
- Mombaerts P. (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713-737.
- Mombaerts P. et al. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.
- Mori K., Nagao H., Yoshihara Y. (1999) The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-715.
- Murdoch B., Roskams A. J. (2007) Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol* 38:581-599.

- Nagano T. et al. (2008) The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science* 322:1717-1720.
- Okayama H., Berg P. (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol Cell Biol* 2:161-170.
- Pellier-Monnin V. et al. (2001) Expression of SCG10 and stathmin proteins in the rat olfactory system during development and axonal regeneration. *J Comp Neurol* 433:239-254.
- Pelosi P. (2001) The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell Mol Life Sci* 58:503-509.
- Phillips H. J., Terryberry J. E. (1957) Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res* 13:341-347.
- Pirez N., Wachowiak M. (2008) In vivo modulation of sensory input to the olfactory bulb by tonic and activity-dependent presynaptic inhibition of receptor neurons. *J Neurosci* 28:6360-6371.
- Pollard K. S. et al. (2006) An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443:167-172.
- Proudfoot N. J., Brownlee G. G. (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263:211-214.
- Raae A. J., Kleppe R. K., Kleppe K. (1975) Kinetics and effect of salts and polyamines on T4 polynucleotide ligase. *Eur J Biochem* 60:437-443.
- Reed R. R. (2003) The contribution of signaling pathways to olfactory organization and development. *Curr Opin Neurobiol* 13:482-486.
- Ressler K. J., Sullivan S. L., Buck L. B. (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255.
- Rietze R. L. et al. (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412:736-739.
- Rinn J. L. et al. (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129:1311-1323.
- Rodolfo-Masera T. (1943) Su l'estistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. *Arch Ital Anat Embryol* 48:157-212.
- Rospars J. P. et al. (1994) Spontaneous activity of first- and second-order neurons in the frog olfactory system. *Brain Res* 662:31-44.
- Royal S. J., Key B. (1999) Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J Neurosci* 19:9856-9864.
- Ryba N. J., Tirindelli R. (1995) A novel GTP-binding protein gamma-subunit, G gamma 8, is expressed during neurogenesis in the olfactory and vomeronasal neuroepithelia. *J Biol Chem* 270:6757-6767.
- Sambrook J., Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd Edition. New York: CSHL Press.

- Santelli G. et al. (1999) Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am J Pathol* 155:799-804.
- Schwarting G. A. et al. (2004) Semaphorin 3A-mediated axon guidance regulates convergence and targeting of P2 odorant receptor axons. *Eur J Neurosci* 19:1800-1810.
- Schwarting G. A. et al. (2000) Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* 20:7691-7697.
- Serizawa S. et al. (2006) A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127:1057-1069.
- Serizawa S. et al. (2003) Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302:2088-2094.
- Shepherd G. M. (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52:864-917.
- Shore D., Langowski J., Baldwin R. L. (1981) DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4833-4837.
- Shou J., Rim P. C., Calof A. L. (1999) BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat Neurosci* 2:339-345.
- Sleutels F., Zwart R., Barlow D. P. (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415:810-813.
- Storz G., Altuvia S., Wassarman K. M. (2005) An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem* 74:199-217.
- Strotmann J. et al. (1994) Rostro-caudal patterning of receptor-expressing olfactory neurones in the rat nasal cavity. *Cell Tissue Res* 278:11-20.
- Strotmann J. et al. (2004) Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J Neurosci* 24:7754-7761.
- Strotmann J. et al. (2000) Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 20:6927-6938.
- Sugino A. et al. (1977) Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends. *J Biol Chem* 252:3987-3994.
- Takeuchi H., Kurahashi T. (2005) Mechanism of signal amplification in the olfactory sensory cilia. *J Neurosci* 25:11084-11091.
- Taniguchi M. et al. (2003) Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J Neurosci* 23:1390-1397.
- Tietjen I. et al. (2003) Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors. *Neuron* 38:161-175.
- Tirindelli R., Ryba N. J. (1996) The G-protein gamma-subunit G gamma 8 is expressed in the developing axons of olfactory and vomeronasal neurons. *Eur J Neurosci* 8:2388-2398.

- Vassalli A. et al. (2002) Minigenes impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb. *Neuron* 35:681-696.
- Vassar R. et al. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
- Venter J. C. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Verghese-Nikolakaki S. et al. (1996) Preliminary findings on the expression of thymosin beta-10 in human breast cancer. *Br J Cancer* 74:1441-1444.
- Verhaagen J., Oestreicher A. B., Gispen W. H., Margolis F. L. (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 9:683-691.
- Wahl G. M., Berger S. L., Kimmel A. R. (1987) Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol* 152:399-407.
- Waterston R. H. et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- Weiler E., Farbman A. I. (1998) Proliferation decrease in the olfactory epithelium during postnatal development. *Ann N Y Acad Sci* 855:230-234.
- Weiss B. et al. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* 243:4543-4555.
- Wellenreuther R., Schupp I., Poustka A., Wiemann S. (2004) SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. *BMC Genomics* 5:36.
- Weternan M. A., van Muijen G. N., Ruiter D. J., Bloemers H. P. (1993) Thymosin beta-10 expression in melanoma cell lines and melanocytic lesions: a new progression marker for human cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 53:278-284.
- Weth F. (1993) Geruchsrezeptoren des Zebrafisch - Untersuchungen zur genomischen Repräsentation und Expression. In: *Universität Tübingen*
- Whitby-Logan G. K., Weech M., Walters E. (2004) Zonal expression and activity of glutathione S-transferase enzymes in the mouse olfactory mucosa. *Brain Res* 995:151-157.
- Willingham A. T., Gingeras T. R. (2006) TUF love for "junk" DNA. *Cell* 125:1215-1220.
- Willingham A. T. et al. (2005) A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* 309:1570-1573.
- Wu H. H. et al. (2003) Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron* 37:197-207.
- Yoshihara S. et al. (2005) Arx homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system. *Development* 132:751-762.

- 
- Yoshihara Y. et al. (1997) OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J Neurosci* 17:5830-5842.
- Yu C. R. et al. (2004) Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 42:553-566.
- Zamore P. D., Haley B. (2005) Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309:1519-1524.
- Zhang X., Firestein S. (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5:124-133.
- Zheng C. et al. (2000) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 26:81-91.
- Zou D. J. et al. (2004) Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 304:1976-1979.
- Zozulya S., Echeverri F., Nguyen T. (2001) The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biol* 2:RESEARCH0018.
- Zufall F., Leinders-Zufall T. (2007) Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* 17:483-489.

## ANHANG I: ABKÜRZUNGEN

Kursiv geschrieben sind Gennamen, die Namen zugehöriger mRNAs sowie wissenschaftliche Bezeichnungen für anatomische Begriffe, die aus dem Lateinischen oder Griechischen entlehnt sind. Für Gennamen wurden die international standardisierten Abkürzungen verwendet.

Neben den konventionellen physikalischen Einheiten und chemischen Symbolen fanden folgende Abkürzungen Anwendung (einige auch im Text erklärt):

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
asRNA	antisense-RNA
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
celu	cohesive end ligation units
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
cfu	colony forming units
CIP	calf intestinal phosphatase (Phosphatase aus Kälberdarm)
cpm	counts per minute (radioaktive Ereignisse pro Minute)
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflußcytometrie)
FCS	Foetales Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
HBSS	Hank's balanced salt solution (Salzlösung nach Hank)
IVT	<i>in-vitro</i> Transkription
kb	Kilobase(n)
MaBS	Maleinsäure-gepufferte Saline
MCS	Multiple Cloning Site

---

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
ncRNA	nicht-kodierende (noncoding) RNA
OD	optische Dichte
OR	olfaktorischer Rezeptor/Geruchsrezeptor
OSN	olfaktorisches sensorisches Neuron
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
piRNA	Piwi-interagierende RNA
PCI	Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur / reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach Reverser Transkription von mRNA
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	small nuclear RNA
sno	small nucleolar RNA
SSC	Natriumcitrat-gepufferte Saline
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivität)
UV	ultraviolettes Licht
v/v	volume per volume (Masse pro Volumen)
w/v	weight per volume (Masse pro Volumen)

## ANHANG II: MATERIALIEN

### Chemikalien

Die verwendeten Grob- und Feinchemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, von den Firmen SIGMA-ALDRICH/Fluka, MERCK oder ROTH bezogen und waren von analytischer Reinheit.

Agarose NEEO-Ultra	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose (LE, Analytical Grade; #V3121)	Promega GmbH, Mannheim
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 4-Toluidinsalz (BCIP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CDP- <i>Star</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dextransulfat, $M_w > 500000$ (# D8906)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4',6-Diamidino-2-phenylindol, Dihydrochlorid (DAPI)	Molecular Probes Inc. /Invitrogen
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entellan®	Merck, Darmstadt
Entwickler (D19, Kodak)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll 400	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fixierer (Kodak)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kresylviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mowiol 4-88	Hoechst/Aventis, Straßbourg, Frankreich
Nitroblautetrazoliniumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammonium-bromid (CTAB)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phase Lock Gel™, heavy	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon K15	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RepelSilan®	Amersham/Pharmacia Biotech
Scintillationsflüssigkeit Ultima Gold™	PerkinElmer LAS Germany GmbH
Silikonlösung	SERVA GmbH, Heidelberg
Tetramisol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek®	SAKURA FINETEK Europe
TRIZOL-Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe



Trypanblau, 0,4%

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>O) aus einer Reinstwasseranlage (ELGA Berkefeld) hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. RNase-freie Lösungen wurden durch Behandlung mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC; 30 min Rühren bei RT) und anschließendes Autoklavieren (120°C, 20 min) hergestellt, nicht mit DEPC behandelbare Lösungen unter RNase-freien Bedingungen mit DEPC-behandeltem Wasser.

### Acetatpuffer

Na-Acetat..... 10,8 g  
in 389,2 ml H<sub>2</sub>O (40 mM)  
Eisessig..... 19,2 ml  
in 1581 ml H<sub>2</sub>O (0,96%), beide Lösungen mischen (= 2 L); pH 3,8 - 4,0

### Concanavalin A-Lösung

Concanavalin A.....6,6 mg  
in 1 ml H<sub>2</sub>O, entspricht 1 mg/ml<sup>8</sup>, sterilfiltriert, Lagerung: -20°C

### CTAB- Lösung

CTAB..... 5 % w/v  
in 0,5 M NaCl

### 50x Denhardt's Reagenz

Ficoll 400.....1 %  
BSA.....1 %  
Polyvinylpyrrolidon K15.....1 %

### Detektionspuffer

Tris-HCl.....100 mM  
NaCl.....100 mM  
pH 8,0

### „Happy membrane“- Lösung

SSC..... 2 x  
SDS..... 0,2 %  
EDTA..... 10 mM

<sup>8</sup> Lediglich 15 % des verwendeten Lyophilisates entsprechen Concanavalin A, daher 6,6-fache Menge als Einwaage.

**Hybridisierungslösung (Standard)**

Formamid.....	50 %
SSC.....	5 x
SDS.....	0,5 %
50x Denhardts Reagenz.....	5 x
Lagerung: -20 °C	

**Hybridisierungslösung (ISH/IHC)**

Formamid.....	50 %
SSC.....	3 x
Dextransulfat.....	10 %
EDTA.....	10 mM
50 x Denhardt's Reagenz.....	1 x
Lagerung: -20 °C	

**Kalium- Phosphatpuffer, 100 mM**

0,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	61 ml
0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	39 ml
H <sub>2</sub> O.....	ad 200 ml
pH 7,0	

**10x Ladepuffer**

Bromphenolblau.....	0,25 % w/v
Glycerin.....	40 % v/v
Lagerung: -20 °C	

**LB- Agar**

Bakterienagar.....	15 g/l
in LB-Medium, autoklaviert, Lagerung: 4 °C	

**LB- Medium**

Trypton / Pepton.....	10 g/l
Hefe-Extrakt.....	5 g/l
NaCl.....	5 g/l
NaOH, 1 M.....	1 ml/l
autoklaviert, Lagerung: 4°C; Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin (LB <sup>Amp</sup> -Medium) bzw. 50 µg/ml Tetracyclin (LB <sup>Tet</sup> , Stammlösung in 96 % Ethanol) vor Gebrauch	

**MaBS**

Maleinsäure.....	0,1 M
NaCl.....	0,15 M
pH 7,5 mit NaOH	

**10x MOPS-Puffer**

MOPS.....	3 M
Na-Acetat.....	3 M
EDTA.....	0,5 M
pH 7,0 mit NaOH	

**Mowiol**

Mowiol 4-88.....	10 %
Glycerin.....	25 % w/v
Tris-HCl.....	0,1 M
pH 8,5	

**PBS**

NaCl.....	137 mM
KCl.....	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	6,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 mM
pH 7,4 -7,5 mit HCl oder NaOH	

**Reaktionspuffer**

Tris.....	100 mM
NaCl.....	100 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	5 mM
pH 9,5 mit HCl	

**SOC- Medium**

Pepton.....	20 g/l
Hefe-Extrakt.....	5 g/l
NaCl.....	0,5 g/l
KCl.....	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	10 mM
1 M NaOH.....	1 ml/l
autoklaviert.	
Zusatz von Glukose.....	3,6 g/l

**20x SSC**

NaCl.....	3 M
Na-Citrat.....	300 mM
pH 7,0	

**STET- Puffer**

Sacharose.....	8 % w/v
Tris/HCl (pH 8,0).....	50 mM

EDTA.....	50 mM
Triton X-100.....	0,1 % v/v

**TAE- Puffer**

Tris.....	40 mM
Essigsäure.....	20 mM
EDTA.....	1 mM

**TBE- Puffer**

Tris.....	90 mM
Borsäure.....	90 mM
EDTA.....	1 mM

**TBS**

Tris.....	100 mM
NaCl.....	150 mM
pH 7,5 mit HCl	

**TE- Puffer**

Tris.....	10 mM
EDTA.....	1 mM
pH 7,5 (RNA) bzw. 8,0 (DNA) mit HCl	

**Medien**

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, # 21969035)	Invitrogen, Karlsruhe
Foetales Rinderserum (FBS)	GIBCO/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HBSS (Hank's Balanced Salts, # H6648)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**Nukleinsäuren und Nukleotide**

DIG-11-dUTP, 1 mM (alkali-stabil)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG-RNA Labeling Mix (10 x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Leiter, 1 kb Plus	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Leiter, peqGOLD Range Mix	peqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
dNTPs (je 100 mM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA (10 mg/ml)	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Lachsspermien-DNA (10,4 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oligonukleotide (Primer) <sup>9</sup>	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
pBluescript I KS Phagemid	Stratagene
poly-Adenylsäure, poly(A), Natrium-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<sup>9</sup> Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Primer mit ihren Kennwerten befindet sich im Anhang III (Tab.1).

Random Hexamere	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Redivue™ 5'-[α- <sup>32</sup> P]-dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg
RNA-Leiter (peqGOLD High Range)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNA, Typ VI (aus <i>Torula</i> -Hefe, R6625)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
tRNA (aus <i>S. cerevisiae</i> , R5636)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Enzyme und andere Proteine

Alkalische Phosphatase, Kälberdarm (CIP)	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/M.
Alkalische Phosphatase, Shrimp (SAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Collagenase, Typ I	Worthington
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase I, RNase-frei	Qiagen GmbH, Hilden
Hotstart <i>Taq</i> - DNA-Polymerase (5 U/μl)	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
Hotstart <i>Pfu</i> Turbo <i>Taq</i> - DNA-Polymerase	Stratagene
Klenow Fragment, exo <sup>-</sup>	Fermentas, GmbH, St. Leon-Rot
Prime RNase-Inhibitor	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Restriktionsendonukleasen	NEB oder Fermentas
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse	
Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Rinderserum-Albumin, acetyliert (Ac-BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNA-Polymerase (T3, T7)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase H	Amersham Biosciences, Freiburg
RNase-Inhibitor (RiboLock™)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Superase-Inhibitor	Ambion
T4 DNA Ligase (2000 celu/μl)	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/M.
T4 DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Terminale Transferase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/M.
Trypsin (10 x, 25 g/ml 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Antikörper

### primäre

Schaf-anti-DIG-Fab, AP-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ziege-anti-GFP (R1091P)	Acris Antibodies GmbH, Herford
Ziege-anti-OMP 255, polyklonal	Dr. Frank Margolis (Dr. Jaques Paysan)

**sekundäre**

Esel-anti-Ziege Cy3-IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe, UK
Esel-anti-Ziege Alexa Fluor® 488 (A11055)	Molecular Probes Inc. /Invitrogen

**Kits**

DNA Clean & Concentrator™-5/-25/-100	Zymo Research Corp., Orange, USA
HNPP Fluorescent Detection Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MicroSpin S-400 HR Columns	GE Healthcare, München
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Megaprime™ DNA Labelling Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

**Geräte**

Analysenwaage CP124S	Sartorius AG, Göttingen
Bildplattenlöschgerät (Eraser)	raytest
Dot Blot-Apparatur (Bio-Dot®)	BioRad Laboratories GmbH, München
Elektroporator 2510	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
Gewebehacker (McIlwain Tissue Chopper)	Mickle Laboratory Engineering Ltd, UK
Glasfilterplatte Porosität 3	Schott Medica GmbH, Wertheim
Handmonitor, Modell LB 122	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Hybridisierungssofen UVP HB-1000	VWR GmbH, Darmstadt
Konfokalmikroskop LSM 510	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Konfokalmikroskop TCS SP5	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Kryostat CM 3050	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Microforge MF-830	Narishige International Inc., USA
Mikroinjektor (CellTram® vario)	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Mikromanipulator, 3-D	Brinkmann Instrumentenbau, Mannheim
Micropipette Puller PP-83	Narishige International Inc., USA
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermocycler PT 100	MJ Research
Phosphorbildplatten (BAS-MS)	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf
Phosphor-Imager FLA-3000	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf

---

Reinstwasseranlage	ELGA Berkefeld GmbH, Celle
Szintillationszähler (Tri-Carb®)	PerkinElmer LAS Germany GmbH
Spektralphotometer (NanoDrop™ 1000)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spektralphotometer (WPA Biowave)	Biometra GmbH, Göttingen
Stereomikroskop S6	Leica Microsystems AG, Wetzlar
UV-Transilluminator TI 2	Biometra GmbH, Göttingen
Vakuumzentrifuge DNA 110-230	Thermo Savant
Zentrifuge (Minispin, RZB <sub>max</sub> : 12100x g)	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R; RZB <sub>max</sub> : 3345xg bzw. 17860xg)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

### **Arbeits- und Verbrauchsmittel**

Filme (Hyperfilm ECL)	GE Healthcare, München
Elektroporationsküvetten (BTX, 2 mm)	VWR GmbH, Darmstadt
Kapillaren, Borosilikatglas 3.3 (# 1408409)	Hilgenberg GmbH, Malsfeld
Küvetten (UVette)	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Neubauer-Zählkammer, geeicht	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Nylonmembran, pos. geladen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nylonmembran (Hybond-NX)	GE Healthcare, München
Nylonnetz-Filter (70 µm, 40 µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Präzisions-Präparierbestecke	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Superfrost®Plus- Objektträger	Menzel Gläser, Deutschland
Whatman-3MM-Papier	Biometra, Göttingen

## ANHANG III: TABELLEN

Tab.1 Verwendete Primer und ihre Kennwerte.

Gen	Acc# <sup>1)</sup>		Primerbezeichnung	Primersequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> <sup>2)</sup>	T <sub>m</sub> <sup>3)</sup>	Position <sup>5)</sup>
<b>Actb 3'</b>	NM_007393.1	fwd	bActin 1650 SacI GC	GCGAGCTCCAGCATTGCTTCTGTGTAAATTATG	59,3	75,0	1570-1792
		rev	bActin 1872 KpnI CG	CGGGTACCGCACTTTTATTGGTCTCAAGTCAGT	59,2	75,3	
<b>OMP 3'</b>	NM_011010.2	fwd	OMP1724 SacI GG	GGGAGCTCGGCATACTGAAGGTAGGATCTGTC	59,1	75,4	1695-2051
		rev	OMP2080 SacI CGT	CGTGAGCTCCAGTCTTTATTGTGAAACAGGCA	57,6	74,8	
<b>OMP 5'</b>	NM_011010.1	fwd	OMP 203 SacI GTG	GTGGAGCTCGGAACGTGGTTCTGGACAAG	57,5	76,2	203-436
		rev	OMP 436 KpnI CGT	CGTGGTACCCAAAGGTGATGAGGAAATACATGAC	59,9	75,3	
<b>Golf 3'</b>	BC078439.1	fwd	Golf2674 SacI GC	GCGAGCTCCCAGTTCTGTTTTTCAGGGTACTAAG	59,0	74,7	2482-2863
		rev	Golf3055 KpnI GG	GGGGTACCGGAACAGCCATTTATTTTGTCTTTA	59,6	74,1	
<b>Golf</b>	XM_128933.2	fwd	Golf 830 SacI CTG	CTGGAGCTCAGACTTCGGGAATCACTGGACCT	52,2	77,4	955-1128
		rev	Golf 1003 KpnI GCA	GCAGGTACCTTCAGGGACAGTATAATTGGCATACTCC	65,5	76,0	
<b>Olf-1 3'</b>	AK035781.1	fwd	Olf-13674 SacI GCT	GCTGAGCTCGTAGCACATTATTCTTGTAGTA	45,1	66,6	3713-3998
		rev	Olf-13959 KpnI CT	CTGGTACCCAATGTACAGGTGAAATGGATAT	54,0	68,9	
<b>Olf-1</b>	NM_007897.1	fwd	Olf-1 1854 SacI AGC	AGCGAGCTCAGGTTGGATTCTGCTACGAAAGTT	60,9	76,2	1809-2094
		rev	Olf-1 2139 KpnI GCC	GCCGGTACCAAAGACAAATGGTTGCAGAGTTAAG	59,5	76,1	
<b>Gap-43 3'</b>	NM_008083.2	fwd	GAP-43_750_SacI_CG	CGGAGCTCGCTGTAGACGAAGCCAAACC	57,6	75,8	601-1036
		rev	GAP-43_1185_KpnI_CGC	CGCGGTACCTGGAACAGAGAGAAATAGAGAGGA	57,4	75,8	
<b>Tubb3 3'</b>	NM_023279.2	fwd	Tubb3_1347_KpnI_GA	GAGGTACCGATGTATGAAGATGATGACGAGGA	58,5	72,4	1305-1600
		rev	Tubb3_1642_SacI_GA	GAGAGCTCCCATAAAAACAGACGAATAAGCAA	58,9	71,3	
<b>SCG10 3'</b>	NM_025285.2	fwd	SCG10_973_SacI_CG	CGGAGCTCTCTTTTGAAGCCCCACTCA	60,4	75,9	888-1738
		rev	SCG10_1823_KpnI_CG	CGGGTACCATGCAGGCAGTTTGGGAGTT	59,5	76,0	
<b>Gng8</b>	NM_010320.3	fwd	Gng8_142EcoRI_GA	GAGAATTCATCCATCATCTATCCTTCGTCTGT	58,8	69,6	(-)494-(-)65



		rev	Gng8_571Kpnl_GA	GAGGTACCCTTGTACACAGTCACACATCATC	57,7	71,9	
<b>Tmsb10</b>	NM_025284.3	fwd	Tmsb10_48EcoRI_GT	GTGAATTCGGAAGGAGAATCCACGAGTTGTAAG	62,8	73,7	(-)28-360
		rev	Tmsb10_435Kpnl_GC	GCGGTACCTTTCTATAATATCCCAGGGCAAACC	62,5	74,6	
<b>ncRNA</b>	NT_109315.4	fwd	Chr4hit_55	ATGGAACTCTGCTACCATCTCAG	59,6	<sup>4)</sup>	1711623-1711861
		rev	Chr4hit_293	AAGATGATGTAAGGGGTAGGGAAG	60,2	<sup>4)</sup>	
<b>Polr2a</b>	NM_009089	fwd	5XiPolr2a412F	AGTCGCTCGAGAAGAAACGGCTTACGCATGT	58,6	77,5	412-944
		rev	5XiPolr2a944R	GTCGTCCTCGAGCCACATGGAAGTGGAGAAG	52,8	75,5	
<b>Poly A+-mRNA</b>	-	-	SR-T24	GTAACTCGAGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	55,5	70,6	-
<b>T3-Promotor</b>	-	-	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	51,0	<sup>4)</sup>	-
<b>T7-Promotor</b>	-	-	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	44,7	<sup>4)</sup>	-
<b>SP6-Promotor</b>	-	-	SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	39,1	<sup>4)</sup>	-

<sup>1)</sup> Accession number der Referenzsequenz (Genbank-Eintrag). <sup>2)</sup> Schmelztemperatur des zur Referenzsequenz komplementären Primerbereiches. <sup>3)</sup> Schmelztemperatur des Primers inklusive Linkersequenz (kursiv). <sup>4)</sup> Primer enthält keine Linkersequenz mit Restriktionsschnittstellen. <sup>5)</sup> Primerposition in Bezug auf Nukleotid 1 der CDS (Adenin des ATG-Startcodons) der Referenzsequenz (komplementäre Bereiche).

**Tab. 2: Charakteristik der verwendeten Digoxigenin-markierten antisense-RNA-Sonden und die letztendlich verwendete Hybridisierungstemperatur.**

Sonde	Länge <sup>1)</sup> (nt)	GC-Gehalt <sup>2)</sup> (%)	T <sub>m</sub> / T <sub>H</sub> (ISH) <sup>3)</sup> (°C)	T <sub>m</sub> / T <sub>H</sub> (Southern) <sup>3)</sup> (°C)
Actb 3'	229/264	44	-	68/58°C
OMP 3'	256/290	57	-	76/70°C
Golf 3'	382/423	46	-	70/58°C
Olf-1 3'	286/344	34	-	61/58°C
Gap-43 3'	436/477	48	-	71/65°C
Tubb3 3'	296/334	54	-	74/62°C
SCG10 3'	525/560	45	-	70/62°C
Gng8	430/472	55	72/70	-
Tmsb10	388/430	54	72/70	-
ncRNA	377/571	48	66/50	-
Polr2a	533/577	52	-	74,5/70°C

<sup>1)</sup> Länge entsprechend der Anzahl zur mRNA-CDS komplementärer Nukleotide innerhalb der Sonde/Gesamtlänge der Sonde. <sup>2)</sup> GC-Gehalt des zur mRNA komplementären Bereichs. <sup>3)</sup> Schmelzpunkt T<sub>m</sub> der Sonde unter Hybridisierungsbedingungen (50 % Formamid, 5x SSC). Berechnungsgrundlagen siehe Tab.3. T<sub>H</sub>: verwendete Hybridisierungstemperatur.

**Tab. 3: Berechnung der Hybridisierungstemperatur/ zugrunde liegende Formeln.**

Hybrid	Art der Hybridisierung	Formel zur Bestimmung von T <sub>m</sub>
RNA/Dig-RNA	Membranfilter (Northern)	$T_m^{\text{Dig}} = 79,8^\circ\text{C} + 18,5 \log c_{\text{cm}} + 58,5 x_{\text{GC}} + 11,8 x_{\text{GC}}^2 - 820/L - 0,35 \text{ C\%FA} - 12,5^\circ\text{C}$
DNA/Dig-RNA	Membranfilter (Southern)	$T_m^{\text{Dig}} = 79,8^\circ\text{C} + 18,5 \log c_{\text{cm}} + 58,4 x_{\text{GC}} + 11,8 x_{\text{GC}}^2 - 820/L - 0,5 \text{ C\%FA} - 12,5^\circ\text{C}$
RNA/Dig-RNA	<i>In situ</i> -Hybridisierung	$T_m^{\text{Dig}} = 79,8^\circ\text{C} + 18,5 \log c_{\text{cm}} + 58,5 x_{\text{GC}} + 11,8 x_{\text{GC}}^2 - 820/L - 0,35 \text{ C\%FA} - 25^\circ\text{C}$
DNA/ <sup>32</sup> P-cDNA	Colony-Filter	$T_m^{\text{Radio}} = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \log c_{\text{cm}} + 41 x_{\text{GC}} - 500/L - 0,62 \text{ C\%FA}$

Dabei bedeutet c<sub>cm</sub> die molare Konzentration einwertiger Kationen [M], x<sub>GC</sub> den GC-Gehalt des Hybrids als Molenbruch, L seine Länge [bp] und C%FA den Zahlenwert des Formamidgehaltes in %.

## ANHANG IV: ZUSÄTZLICHE DATEN

**Abb. 1:** Längste nach Sequenzierung identifizierte *ncRNA*-Sequenz (377 bp; Klon F2K34) mit Kennzeichnung der poly(A)-Signalsequenz 20 Nukleotide vor der Bindungsstelle des SR-T<sub>24</sub>-Primers.

```
5' ACTCagaGATCCCTGCCTCTGCCTCCCAAGGGGAACTGTCAGCATTCTACAAGAATGGAAACTCTGCTAC
CATCTCAGGTGTTGGGCCTTATTCGGCCAGATTCTGAGGCCTAGTGAGGAAACCTGAGCCTCTGCTCGAG
TTTAGAGACCTACCTTGCTCACTTCCATACTGGAGTGACTCAGCAAGACCTGCTTAAGCCTGCCTTTGCCA
AGCTACCAATGGTGTAGAATAACTTTATTGGCCCTGTCAGTCATCCCACACTGTCACCCTTCCCTACCCCTT
ACATCATCTTACCTCACCAAAAATCCCCACCTCCTTCCTCAACCCTGTATAAACAAAAGACTGATACAATAAA
AACTAGTTCCTGCTTTGAcAAG 3'
```

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Jegliche aus anderen Quellen sinngemäß oder wörtlich übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl des Materials für die vorliegende Dissertationsschrift, speziell bei der Zusammenstellung der Ergebnisse zur Ligation, wurde ich von Dr. Franco Weth unterstützt. Es wurde von mir weder entgeltliche Hilfe von Promotionsberatern oder anderen Personen in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertationsschrift bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in wesentlichen Teilen ähnlicher Form als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht oder einer anderen Hochschule zur Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb eines akademischen Grades vorgelegt wurde. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.



Jena, 18. August 2009

Natja Haag

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle ganz herzlich all jenen danken, die mich während der vergangenen Jahre beruflich wie privat unterstützt haben und somit zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bolz danke ich recht herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für seine Unterstützung und stete kritische Diskussionsbereitschaft während der Arbeit an meiner Promotion. In gemeinsamen Seminaren hatte ich die Gelegenheit, meine Daten zu präsentieren und bekam durch diesen Austausch stets neue Impulse für meine Arbeit.

In ganz besonderem Maße möchte ich mich bei Dr. Franco Weth bedanken, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Nachwuchsgruppe ein inhaltlich wie methodisch anspruchsvolles und aus entwicklungsbiologischer Sicht hochinteressantes Thema zu bearbeiten. Er stand mir jederzeit mit kompetentem Rat zur Seite und hat mich dabei unterstützt, mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich weiterzuentwickeln – danke dafür!

Frau Prof. Dr. Siegrid Löwel möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und ihre konstruktiv-kritische Diskussion der Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching danke ich in ihrer Funktion als externe Gutachterin für die Übernahme des Drittgutachtens.

Bei den ehemaligen Mitgliedern der Nachwuchsgruppe Neurogenetik – Ronny Niehage, Philipp Kaiser, Christoph Gebhardt, Silke Schreiber, Liane Dahm, Susanne Bürger und Bernd Schlupeck möchte ich mich von ganzem Herzen für die tollen gemeinsamen Jahre bedanken, in denen wir nicht nur Leidensgenossen im Labor waren, sondern auch viel zusammen gelacht haben. Das freundschaftliche Verhältnis zu euch allen hat mir viel gegeben. Ihr wart das beste Team aller Zeiten!

Silke Schreiber möchte ich an dieser Stelle extra danken. Sie hat mich als Technische Assistentin in der Nachwuchsgruppe Neurogenetik vor allem bei der Etablierung anspruchsvoller Methoden sehr unterstützt und dabei große Ausdauer und „Leidensfähigkeit“ bewiesen.

Jessica Heyder möchte ich ganz herzlich für ihre praktische Unterstützung bei der erfolgreichen Durchführung der finalen Doppelmarkierungen danken.

Meinen lieben Freunden Nadine Knoll, Nadine Stahmann, Sandra und Mario sowie meinen Kollegen Tina, André und Geraldine möchte ich für ihre moralische und motivierende Unterstützung danken sowie dafür, dass sie immer verständnisvoll akzeptiert haben, wenn ich in den vergangenen Jahren zu wenig Zeit für sie hatte.

Tobias Pöhlmann, Tina Rüdiger, Sandra Köhn und Hendrik Schäfer vom „Intelligent siRNA“-Team danke ich sehr für ihre Unterstützung während der Zeit des Zusammenschreibens meiner Dissertation und ihr Verständnis für meine zeitweise physische wie mentale Abwesenheit.

Marco - dir danke ich von ganzem Herzen, dass du mich in so manch schwieriger Phase der letzten Jahre immer aufgefangen und in meinem Tun bestärkt hast. Ich bin froh, dich an meiner Seite zu haben!

Ein ganz lieber Dank geht natürlich an meine lieben Eltern sowie meine beiden Großmütter, die mich immer schon darin unterstützt und bestärkt haben, meine Ziele zu verwirklichen. Ohne die moralische und oft genug auch finanzielle Hilfe meiner Familie und meiner „Fast-Schwiegermama“ Steffi wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Natja Haag

Geboren am 18. Juni 1977 in Zeulenroda

## Schulbildung

1984-1991 Polytechnische Oberschule „Theodor Neubauer“ Triebes

1991-1996 Friedrich-Schiller-Gymnasium Zeulenroda

Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife, Note „sehr gut“ (1,2)

## Studium

1996-2002 Studium der Biologie (Diplom) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena,  
Fächer: Zoologie (HF), Neurobiologie, Pharmakologie, Mikrobiologie

2001-2002 Diplomarbeit am Institut für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Thema: „Modulation von Zellwachstum und Genexpression durch Eisen und Butyrat in humanen Kolonzelllinien“

März 2003 Diplom, Note „sehr gut“ (1,0)

## Promotion

2003-2009 Promotion, Nachwuchsgruppe Neurogenetik, IZKF, Universitätsklinikum Jena  
Thema: „Differenzielle Einzelzell-Transkriptomanalyse zur Identifizierung geruchsrezeptorassoziierter Differenzierungsmoleküle während der Entwicklung des olfaktorischen Systems der Maus“

seit 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin im EXIST-Gründungsprojekt „Intelligente siRNA“, Friedrich-Schiller-Universität Jena

## Stipendien

2004 LUBOM-Stipendium der Friedrich-Schiller Universität Jena

2005 Boehringer Ingelheim Fond, Reisestipendium für die Teilnahme am Workshop “Advanced techniques in molecular neuroscience”, 6.-21. Juli 2005, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

## Eigene Publikationen

### Originalarbeiten

Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, **Haag N**, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Scheele J, Pool-Zobel BL: Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. Mutation Research, 9496:1-14, 2003

Kautenburger T, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, **Haag N**, Kuhler S, Kuchler A, Weise A, Marian B, Peters WH, Liehr T, Claussen U, Pool-Zobel BL: The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. J Cancer Res Clin Oncol. 131(10):692-700, 2005

**Haag N**, Schreiber S, Weth F: A novel low-background ligation procedure for high-efficiency cloning of single-cell cDNA libraries. Manuskript

**Haag N** and Weth F: Global single cell transcriptional profiling identifies a novel non-coding RNA differentially expressed during olfactory sensory neuron differentiation. Manuskript

### Poster

Festag G\*, **Haag N**\*, Beyer-Sehlmeyer G, Ebert MN, Marian B, Pool-Zobel BL: Butyrate inhibits cell survival and Glutathione S-transferase expression in human colonic adenoma cells. Symposium of the DFG-Senate Commission on Food Safety (SKLM) „Functional Food: Safety Aspects“, Karlsruhe, 2002

**Haag N**, Schreiber S, Weth F: A protocol for single-cell transcriptional analysis of regenerating mouse olfactory sensory neurons. In: Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society/ 30th Göttingen Neurobiology Conference 2005 (Zimmermann H and Kriegstein H, Eds.), Neuroforum, 1 Suppl.:129B

### Vorträge

Workshop “Advanced techniques in molecular neuroscience”, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA, 2005, Vortrag mit dem Titel: „Single-cell transcriptional analysis of developing mouse olfactory sensory neurons“.